

**Selbstreplizierende nicht-virale Episomen
(*Minicircles*): Expressionseigenschaften und
Etablierung im Zellkern**

**Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig**

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Sandra Verena Ursula Broll
aus Dortmund

1. Referent:	apl. Prof. Dr. Jürgen Bode
2. Referent:	Prof. Dr. Stefan Dübel
eingereicht am:	30.03.2009
mündliche Prüfung (Disputation) am:	06.08.2009

Druckjahr 2009

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Nehlsen K.*, Broll S.*, Bode J. (2006): Replicating minicircles: Generation of nonviral episomes for the efficient modification of dividing cells. *Gene Ther. Mol. Biol.* 10: 233-244.

Iqbal K., Barg-Kues B., Broll S., Bode J., Niemann H., Kues W. A. (2009): Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos. *BioTechniques* 47 (5): 959–968.

Populärwissenschaftliche Artikel

Broll S., Nehlsen K. & Bode J. (2007): Kleine Kreise mit großem Potenzial. *Chem. Rundschau* 2007(1-2): 40-41.

Tagungsbeiträge

Nehlsen K., Broll S. & Bode J. Episomal Replicating Minicircles. Tagungsbeitrag. EpiVector Meeting, 3.-4.2.2006, Amsterdam.

Broll S., Nehlsen K. & Bode J. Replicating minicircles: Generation of nonviral episomes for the efficient modification of dividing cells. Tagungsbeitrag. ESGT/CliniGene Satellite, 9.-10.11.2006, Athen.

Nehlsen K., Broll S., Oumard A., Qiao J. & Bode J. Chromosome-based Vectors for Predictable Antibody Production. Tagungsbeitrag. Antibody Workshop TU Braunschweig, 6.-7.12.2006, Braunschweig.

Nehlsen K., Broll S., Kandimalla R. & Bode J. Generation of stable, nonviral replicating minicircles by the use of S/MAR elements. Tagungsbeitrag 1st International Workshop on Minicircle-DNA, 22.2.-23.2.2007, Bielefeld.

Nehlsen K., Broll S., Kandimalla R. & Bode J. Chromosome-based Expression Systems: Origin, Applications and Performance. Tagungsbeitrag. CliniGene 1st Anniversary meeting, 30.3.-1.4. 2007, Annecy.

Nehlsen K., Broll S., Kandimalla R. & Bode J. Generation of stable, nonviral replicating minicircles by the use of S/MAR elements. Tagungsbeitrag. CliniGene Training Course, 12.-13.7.2007, Barcelona.

Broll S., Nehlsen K., Oumard A. & Bode J. S/MARs enable the Generation of Nonviral Replicating Minicircles. Poster. Moleda Summer School - Non-viral gene transfer into muscle and skin, 16.-22.9.2007, Evry-Maison Alfort.

Broll S., Nehlsen K., Oumard A., Bode J. S/MARs enable the generation of nonviral replicating minicircles. Tagungsbeitrag UC Davis Transgenic Animal Research Conference VI. 12.-16.8.2007, Granlibakken/Lake Tahoe. Abstract: *Transgenic Research*. Oct. 2007, 16: 839-863

Broll S., Nehlsen K., Bode J. Replicating Non-Viral Minicircles: Novel Tools for Predictable Transgenesis. Tagungsbeitrag ESGCT, 27.-30.10.2007, Rotterdam. Abstract: *Human Gene Therapy*. Oct. 2007, 18(10): 941-954

Broll S., Kandimalla R. Oumard A. & Bode J. Replicating nonviral minicircles for protein production in eukaryotic cell lines. Tagungsbeitrag. INFORMA, 3.3.2008, Prag.

Broll S., Oumard A. & Bode J. Replicating nonviral minicircles: Novel tools for predictable transgenesis. Tagungsbeitrag. CliniGene 2nd Anniversary meeting, 3.-7.4.2008, Annecy.

Broll S., Nehlsen K., Oumard A. & Bode J. Replicating nonviral minicircles: Novel Tools for the predictable transgenesis of dividing cells. Tagungsbeitrag. 2nd International Workshop on Minicircle-DNA, 7.5. – 9.5.2008, Bielefeld.

Broll S., Oumard A. & Bode J. Prediction of gene-regulatory and replication functions by SIDD structure analysis. Tagungsbeitrag. ESGCT/CliniGene Satellite, 13.11.2008, Brügge.

Broll S., Oumard A., Benham C., Goetze S. & Bode J. Prediction of gene-regulatory and replication functions by SIDD structure analysis. Tagungsbeitrag. ESGCT, 16.11.2008, Brügge. Abstract: *Human Gene Therapy*. Oct. 2008, 19(10): 1060–1075.

Qiao J., Broll S., Oumard A. & Bode J. Chromatin minidomains in research and protein production. Tagungsbeitrag. INFORMA, 2.-3.3.2009, Berlin.

Broll S., Oumard A. & Bode J. Replicating Nonviral Minicircles: Novel Tools for Predictable Transgenesis. Tagungsbeitrag. CliniGene 3rd Anniversary meeting, 2.-5.4.2009, Annecy.

Qiao J., Broll S., Oumard A. & Bode J. Novel chromosome-based vectors: Chromatin minidomains and minicircles. Tagungsbeitrag. BSGT Annual Conference, 21.-23.4.2009, London.

Inhalt

Inhalt	i
I. Zusammenfassung	v
1. Einleitung.....	1
1.1 Der Zellkern	1
1.1.1 Die Organisation des Chromatins und der <i>Histon Code</i>	2
1.1.2 Die Kernmatrix.....	3
1.1.3 <i>Scaffold/Matrix Attachment Regions</i> (S/MARs).....	4
1.2 Der Zellzyklus	7
1.3 Gentherapie.....	8
1.3.1 Virale Vektoren in der Gentherapie	9
1.3.2 Nicht-virale Alternativen: Von der Plasmid-DNA zu <i>Minicircles</i>	10
1.3.3 pEpi – ein episomal replizierendes Plasmid zum nicht-viralen Gentransfer.....	13
1.4 Sequenzspezifische Rekombination und das Flp/FRT-System.....	14
1.5 Aufgabenstellung	16
2. Ergebnisse.....	17
2.1 Etablierung eines episomal replizierenden <i>Minicircle</i> -Vektors in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien.....	17
2.1.1 Etablierung und Expressionsverhalten der episomal replizierenden Vektoren	17
2.1.2 Untersuchung des episomalen Status durch Southern Blot-Analysen ..	20
2.1.3 Nachweis des episomalen Status mit FISH.....	23
2.2 Untersuchungen an CHO-K1-Klonen	25
2.2.1 Generierung und Charakterisierung der CHO-K1-Klone	25
2.2.2 Stabilität des episomalen Zustandes und der Transgenexpression des <i>Minicircle</i> -Vektors nach Kryokonservierung der CHO-K1-Klone	29
2.2.3 Untersuchung von Deletionsereignissen in der <i>Minicircle</i> -DNA	31
2.3 Charakterisierung eines größenreduzierten S/MAR-Elements.....	33
2.3.1 Sequenzanalyse und biomathematische Vorhersage des S/MAR- Charakters eines größenreduzierten S/MAR-Elements	33
2.3.2 Herstellung eines replizierenden <i>Minicircles</i> -Vektors auf der Grundlage des größenreduzierten S/MAR-Elements M18	36
2.3.3 Vergleich von M18- und SAR E-basierten <i>Minicircle</i> -Vektoren	37
2.3.4 Vergleich von M18- und SAR E-basierten pEpi-Vektoren	40

2.3.5	Untersuchung der transkriptionellen Termination in episomal replizierenden SAR E- und M18-Vektoren	43
2.4	Konzeption, Produktion und Charakterisierung eines industriell hergestellten, episomal replizierenden <i>Minicircle</i> -Vektors.....	46
2.4.1	Vergleich der mittels unterschiedlicher Herstellungsverfahren erzeugten <i>Minicircle</i> -Vektoren	47
2.5	Transfektionseffizienz und Etablierungsrate eines <i>Minicircle</i> -Vektors in Abhängigkeit von Zellzyklusphase und Chromatinstruktur.....	50
2.5.1	Synchronisation von CHO-K1-Zellen und Transfektion in verschiedenen Zellzyklusphasen.....	51
2.5.2	Einfluss der Zellzyklusphase und der Chromatinstruktur auf die transiente Expression von <i>Minicircle</i> -DNA	54
2.5.3	Einfluss der Zellzyklusphase und der Chromatinstruktur auf die Etablierung des episomal replizierenden <i>Minicircle</i> -Vektors	55
3.	Diskussion.....	59
3.1	Die Deletion der prokaryotischen Sequenzen verbessert die Eigenschaften eines nicht-viralen replizierenden Episoms	59
3.1.1	Die Anreicherung stabil exprimierender und replizierender Zellen ist ohne Selektionsdruck möglich.....	60
3.1.2	Der <i>Minicircle</i> -Vektor reduziert das Risiko der Insertionsmutagenese ..	62
3.1.3	<i>Minicircle</i> -basierte CHO-K1-Zelllinien sind stabil.....	63
3.2	SIDD-Profilen können die Eigenschaften episomal replizierender, S/MAR-basierter Vektoren voraussagen.....	64
3.3	Ein industriell hergestellter, S/MAR-basierter <i>Minicircle</i> repliziert episomal	67
3.4	Histon-Hyperacetylierung verbessert die Etablierungsrate eines <i>Minicircle</i> -Vektors	68
3.5	Ausblick	70
3.5.1	<i>Minicircles</i> für die industrielle Herstellung von rekombinanten Proteintherapeutika	70
3.5.2	Generierung transgener Tiere	71
3.5.3	Episomal replizierende 1- und 2-LTR- <i>Circles</i> als neuartige Vehikel in der Gentherapie.....	71
4.	Material und Methoden.....	73
4.1	Geräte.....	73
4.2	Materialien	74
4.2.1	Filterpapiere und Transferfolien.....	74
4.2.2	Autoradiographie	74

4.2.3	Chemikalien.....	74
4.2.4	Zellkulturmaterialien	74
4.2.5	Computerprogramme	74
4.3	Allgemeine Grundtechniken.....	75
4.3.1	Sterilisieren.....	75
4.3.2	Fällung von Nukleinsäuren	75
4.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	75
4.4	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	76
4.4.1	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	76
4.4.2	Kulturmedien für Bakterien	76
4.4.3	Herstellung von Agarplatten	76
4.4.4	Herstellung elektrokompeter Bakterien	77
4.4.5	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	77
4.4.6	Konservieren von Bakterienkolonien	78
4.5	Isolierung von Nukleinsäuren	78
4.5.1	Plasmidisolierung im analytischen Maßstab mit der „Boiling Prep“-Methode.....	78
4.5.2	"Midi"-Plasmidpräparation (Qiagen)	79
4.5.3	DNA-Rückgewinnung aus Gelen mit dem 'QIAquick' Gel Extraktions Kit	79
4.5.4	Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen: Quick-DNA (nach Ramirez-Solis et al., 1995)	79
4.5.5	RNA-Isolierung	80
4.6	DNA-Modifizierung.....	81
4.6.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	81
4.6.2	Auffüllen von 5'-überstehenden Enden.....	81
4.6.3	Dephosphorylierung	81
4.6.4	Ligation von DNA-Fragmenten zur Transformation	82
4.7	Charakterisierung von Nukleinsäuren.....	82
4.7.1	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	82
4.8	Radioaktive Nachweismethoden	84
4.8.1	DNA-Markierung mit dem "Rediprime DNA Labelling System"	84
4.8.2	Klenow-Markierung.....	84
4.8.3	„Southern Blotting“	84
4.8.4	„Northern Blotting“	86

4.9	Gelelektrophorese	87
4.9.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	87
4.10	Arbeiten mit eukaryotischen Zellkulturen.....	88
4.10.1	Verwendete Zelllinien	88
4.10.2	Medien und Lösungen	88
4.10.3	Kultivierung von Zelllinien.....	89
4.10.4	Passagieren.....	89
4.10.5	Langzeitlagerung von Zellen	89
4.10.6	Gentransfermethoden.....	90
4.10.7	Durchführung einer Selektion	90
4.11	Durchflusszytometrie	91
4.11.1	Nachweis von GFP im FACS und <i>Sorting</i> mittels FACS	91
4.11.2	Zellzyklusanalyse	91
4.12	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	92
4.12.1	Metaphase- <i>spreads</i>	92
4.12.2	Herstellung der DNA-Sonden mittels Nick-Translation.....	92
4.12.3	<i>In situ</i> Hybridisierung	93
4.12.4	Mikroskopische Auswertung der <i>in situ</i> Hybridisierungen	94
4.13	Produktion und Aufreinigung von <i>Minicircle</i> -DNA.....	94
4.13.1	Vermehrung und Rekombination der DNA in MM294-Flp- <i>E. coli</i> -Zellen.....	94
4.13.2	Aufreinigung der <i>Minicircle</i> -DNA aus dem Plasmid-Gemisch durch Gelextraktion	95
4.13.3	Aufreinigung der gelextrahierten DNA mit ATP-abhängiger DNase (optional).....	95
4.13.4	Alternative Aufreinigung der <i>Minicircle</i> -DNA	96
4.14	Plasmide und Oligonucleotide	97
4.14.1	Primer	97
4.14.2	Plasmide.....	97
4.14.3	<i>Minicircle</i> -DNA.....	99
5.	Abkürzungen	101
6.	Literatur	105
7.	Danksagung	119

I. Zusammenfassung

Nicht-virale episomal replizierende Vektorsysteme werden als sichere Alternative zu den bisher eingesetzten viralen Vektoren für die Gentherapie gesehen, da sie das Risiko der Insertionsmutagenese und immunogenen Reaktion des Wirtsorganismus umgehen. Der Prototyp eines solchen zirkulären, replizierenden Episoms, das Plasmid pEpi, basiert auf einer S/MAR (*scaffold matrix attachment region*), die über ihre Affinität mit dem Kernmatrix-Protein SAF-A die stabile Replikation sowie die Segregation des Vektors bei der Zellteilung vermittelt. Die Etablierung des Episoms in der Zelle setzt allerdings einen initialen Selektionsdruck voraus, was eine klinische Anwendung ausschließt. Zudem unterliegt pEpi in verschiedenen Zelltypen epigenetischen Inaktivierungsmechanismen, die zum Rückgang der Transgenexpression und, in teilenden Zellen, zu seinem Verlust führen. Ein vielversprechender Lösungsansatz für diese Probleme ist die Entfernung der prokaryotischen Plasmidsequenzen einschließlich des Selektionsmarkers durch sequenzspezifische Rekombination in *E. coli*, also die Übertragung des in den letzten Jahren zunehmend populären *Minicircle*-Konzepts auf das Plasmid pEpi. Dieser S/MAR-basierte Vektor stellt damit den ersten autonom replizierenden *Minicircle* zur Modifikation teilender Zellen dar.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurde dieser neuartige *Minicircle* bezüglich seiner Expressionseigenschaften und Etablierung im Zellkern charakterisiert, um eine Grundlage für seine Anwendung in der Gentherapie oder auch biotechnologischen Herstellung pharmazeutisch relevanter Proteine zu schaffen. Es wurde zunächst gezeigt, dass sich der *Minicircle* in mehreren Zelllinien ohne Selektionsdruck etablieren lässt und episomal repliziert wird. Ein S/MAR-internes Deletionseignis führte zu der Entdeckung eines funktionellen Minimal-S/MAR-Elements, das die Stabilität des *Minicircles* und seine Transgenexpression weiter verbessert. Dieser optimierte, episomal replizierende Vektor wurde schließlich in industrieller Zusammenarbeit als hochreine *supercoiled Minicircle*-DNA großtechnisch hergestellt und in verschiedene Kooperationen, zum Beispiel zur Generierung transgener Tiere, eingebracht.

Die episodale Persistenz S/MAR-basierter Vektoren, das heißt ihre ORI-Funktion, hängt von einer aktiven Trennung der DNA-Stränge ab. Diese wird im Bereich der S/MAR durch gerichtete Transkription initiiert. pEpi-Derivate, insbesondere *Minicircles*, wurden daher bezüglich ihrer Transkription, mRNA-Prozessierung und Translation untersucht, wobei die transkriptionelle Termination mit der Tendenz zur Strangtrennung im Bereich der Polyadenylierungsstelle korrelierte. Letztere spiegelt sich im SIDD (*stress-induced duplex destabilization*)-Profil wider.

Die Etablierung S/MAR-basierter episomaler Vektoren in der Wirtszelle ist von den Gegebenheiten der Kernarchitektur abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass die Etablierungsrate durch eine Auflockerung des Chromatins mittels Histon-Hyperacetylierung zum Zeitpunkt der Transfektion verbessert werden kann, wohingegen die Zellzyklusphase gemäß den bisherigen Untersuchungen keinen Einfluss hat.

1. Einleitung

1.1 Der Zellkern

In Eukaryoten ist die Erbinformation, die DNA, zum Großteil in den Chromosomen des Zellkerns lokalisiert. Das Genom des Menschen beispielsweise besteht aus etwa $3,2 \times 10^9$ Basenpaaren, die auf 24 unterschiedliche Chromosomen verteilt sind. Jedes Chromosom besteht aus einem einzigen linearen DNA-Molekül, das zwischen 1,6 und 8,2 cm lang ist, und angelagerten Proteinen, die eine Verdichtung der DNA um das 10.000fache ermöglichen. Dieser Komplex aus DNA und Proteinen wird Chromatin genannt. Die einzelnen Chromosomen liegen in sogenannten Chromosomen-Territorien vor (Cremer et al., 2000).

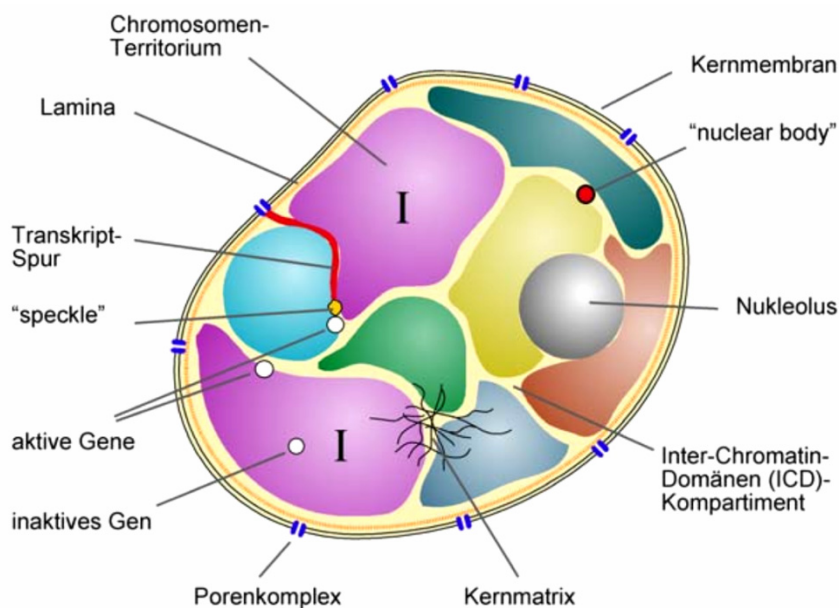


Abb. 1.1: Aufbau des Zellkerns

Der Zellkern ist ein mosaikartig zusammengesetztes Organell, das durch die Kernhülle vom Zytoplasma abgetrennt wird. Sein Inneres ist in strukturell und funktionell getrennte Bereiche unterteilt (sog. Kompartimente). Die Chromosomen-Territorien sind hier farbig dargestellt, im dazwischenliegenden Inter-Chromatindomänen-Kompartiment sind die Kernkörperchen (*nuclear bodies*) eingebettet (aus Fackelmayer, 2000).

Die Lage eines solchen Territoriums wird offenbar von dessen transkriptioneller Aktivität beeinflusst. Das humane, transkriptionell aktive Chromosom 19 ist eher im Inneren des Zellkerns lokalisiert, während das inaktivere Chromosom 18 in der Nähe des Kernrandes liegt (Croft et al., 1999). Innerhalb eines solchen Territoriums liegen inaktive Gene im kompakten Zentrum, die aktiven Gene dagegen an der

Oberfläche, wo Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen einen leichten Zugang zur DNA haben (Dietzel et al., 1999). Die Chromosomen-Territorien sind durch chromatinfreie Bereiche, das Inter-Chromatindomänen-Kompartiment (ICD), voneinander getrennt. In diesem liegen die sogenannten Kernkörperchen oder *nuclear bodies*, die an RNA-Prozessierung, Expression und Replikation beteiligt sind (Brown et al., 2008). Wie die Lage der Chromosomen-Territorien selbst ist auch die der Kernkörperchen nicht strikt, sondern in Grenzen dynamisch (Brian et al., 2003).

Mikroskopisch lassen sich im Interphasekern zwei unterschiedlich stark kondensierte Formen des Chromatins erkennen: Eine schwach kondensierte Form, die Euchromatin genannt wird und für die aktive Gentranskription zugänglich ist und das dicht kondensierte und normalerweise transkriptionell inaktive Heterochromatin.

1.1.1 Die Organisation des Chromatins und der *Histon Code*

Die erste und grundlegende Stufe der Chromosomenorganisation bilden die Nukleosomen, die für eine 6- bis 7-fache Komprimierung der DNA sorgen. Jedes Nukleosomenpartikel besteht aus einem 146 Basenpaare langen DNA-Stück, das in knapp zwei Windungen um ein Oktamer aus den Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 gewickelt ist (Richmond et al., 1984). Histonproteine bestehen aus einer globulären Proteindomäne sowie ein bis zwei flexiblen N- oder C-terminalen Armen und sind evolutionär hochkonserviert. Sie haben aber nicht nur eine strukturelle, sondern auch eine regulatorische Funktion: Ihre Aminotermini können kovalent modifiziert werden, Hauptfunktion dieser enzymatisch katalysierten Modifizierung der sogenannten „Histonschwänze“ ist offenbar die „Markierung“ bestimmter Chromatinbereiche. Dieser sogenannte *Histon Code* dient zur Rekrutierung spezifischer Proteine, die entweder eine weitere Verdichtung des Chromatins bewirken oder den Zugriff auf die DNA erleichtern. Zu den posttranslationalen Veränderungen der Histonschwänze gehören Phosphorylierung (Serin/Threonin), Acetylierung (Lysin), Ubiquitinierung (Lysin), Sumoylierung (Lysin) und die Methylierung (Lysin, Arginin). Konstitutives und auch fakultatives Heterochromatin zeichnet sich besonders durch die Hypoacetylierung der Histone H3 und H4 sowie Methylierung des Lysinrestes 9 am Histon H3 aus (Richards et al., 2002; Jenuwein et al., 2001). Histon-Hyperacetylierung ist dagegen typisch für das transkriptionell aktive Euchromatin, die (reversible) Acetylierung der Lysinreste an H3 und H4 führt zu einer Abschwächung der positiven Ladung des Proteins und somit zu einer Verringerung der Bindungsstärke im DNA-Histon-Komplex (Bode et al., 1986; Wolffe und Pruss, 1996).

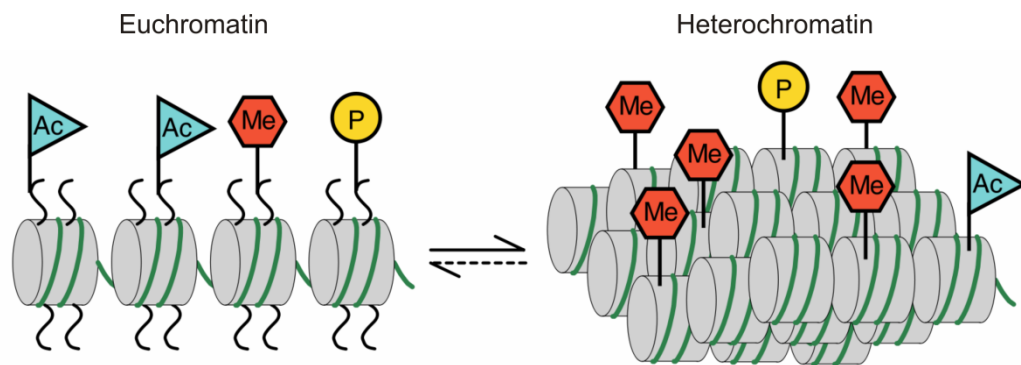


Abb. 1.2: Der Histon Code

Schematische Darstellung der vorherrschenden Histonmodifikationen im offenen Euchromatin und kondensierten Heterochromatin. Die NH_2 -Termini der Histone sind hier phosphoryliert (P; Serin/Threonin), acetyliert (Ac; Lysin) oder methyliert (Me; Lysin, Arginin) (aus Jenuwein et al., 2001).

Zwischen den Nukleosomenkernen liegt die sogenannte *linker*-DNA, die bis zu 80 Basenpaare umfassen kann. Durch einen Verdau mit der Mikrokokken-Nuklease kann diese *linker*-DNA abgebaut werden, so dass je nach eingesetzter Menge und Dauer des Verdaus Chromatin-Fragmente oder nur noch Mono-Nukleosomen frei werden. In diesem Abschnitt der DNA bindet das Histon H1, das zur Ausbildung der 30 nm-Faser beiträgt, die eine weitere Komprimierung der DNA um das 40-fache ermöglicht. Die dritte Kondensationsstufe beinhaltet die schlaufenförmige Anheftung der DNA an die Kernmatrix. Die 5 bis 200 kb großen, voneinander unabhängigen DNA-Schleifen eines Interphasekerns sind im Elektronenmikroskop nach der Beseitigung der Histone sichtbar. In Metaphase-Chromosomen sind diese Schleifen extrem dicht in radialer Anordnung gepackt. Jede Schleife ist sowohl topologisch als auch regulatorisch eine eigenständige Einheit.

1.1.2 Die Kernmatrix

Die Kernmatrix ist ein Gerüst, analog zum Zytoskelett, und durchzieht das gesamte Innere des Zellkerns. Sie ist maßgeblich an der Kompartimentierung des Zellkerns in Chromosomen-Territorien und Inter-Chromatindomänen-Kompartiment beteiligt (Ma et al., 1999). Neben strukturegebenden Proteinen, wie den Laminen A-C (Ludérus et al., 1992 und 1994), enthält die Kernmatrix vor allem RNA, außerdem regulatorisch wichtige Faktoren und Enzyme, wie die DNA-Polymerasen α und β (Foster & Collins, 1985), die RNA-Polymerase II (Lewis et al., 1984), die DNA-Methyltransferase (Burdon et al., 1985) und Histondeacetylasen sowie Acetyltransferasen (Hendzel et al., 1991 und 1994). Das in vielen Zellen am häufigsten auftretende Enzym des Proteinnetzwerks ist die Topoisomerase II (Gasser et al., 1986; Mirkovitch et al., 1988), welche sowohl strukturelle als auch regulatorische Funktionen ausübt. Die Topoisomerase II kann durch die Einführung

von Doppelstrangbrüchen topologische Spannungen der DNA auflösen und nimmt somit Einfluss auf die Struktur und die damit verbundene Zugänglichkeit der DNA sowie die Genexpression. Weitere Kernmatrix-Proteine sind SAF-A/hnRNP-U (Roemig et al., 1992), SAF-B (Renz und Fackelmayer, 1996), SATB1 (Dickinson et al., 1992 und 1997) und ARBP/MeCP2 (von Kries et al., 1991; Weitzel et al., 1997), welche an der RNA-Verpackung, *splicing* oder Methylierung beteiligt sein können. Für die Proteine SAF-A (de Belle et al., 1998) und SATB1 wurde eine *in vivo*-Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen nachgewiesen (Fackelmayer, 1994), welche für die Verankerung der DNA mit der Kernmatrix und somit für die Schlaufenstruktur des Chromatins verantwortlich sind. Diese DNA-Sequenzen werden *Scaffold/Matrix Attachment Regions* (S/MARs) genannt (Paulson und Laemmli, 1977; Cockerill et al., 1986). Der Aufbau des Kerngerüsts aus verschiedenen strukturgebenden und regulatorisch wirksamen Proteinen sowie RNA führte zu der gängigen Annahme, dass die Kernmatrix als Plattform für unterschiedlichste im Zellkern ablaufende Prozesse dient, in der DNA, RNA und Proteine räumlich miteinander verbunden werden. Wird beispielsweise die Transkription in einer Zelle gehemmt, kommt es zu einem Zusammenbruch der Kernmatrix (Nickerson et al., 1989; Fey et al., 1986).

1.1.3 *Scaffold/Matrix Attachment Regions* (S/MARs)

S/MAR-Elemente haben eine Länge von 200 bis 3000 Basenpaaren. Viele S/MAR-Sequenzen besitzen einen AT-Gehalt von etwa 70% insbesondere in Form von längeren, ununterbrochenen Oligo-(dA)- oder (dT)-Folgen, es gibt jedoch keine Konsensussequenz. S/MARs scheinen aber allesamt eine hohe Tendenz zur Strangtrennung aufzuweisen (Bode et al., 1992) und stellen sogenannte *base-unpairing regions* (BURs) dar. Diese Eigenschaft diente als Grundlage zur Entwicklung von computergestützten Vorhersageprogrammen für diese DNA-Elemente (*Stress-Induced Duplex Destabilization Profile*, SIDD, Benham et al., 1997 und MAR-Finder, Singh et al., 1997).

Ein SIDD-Profil beschreibt die Stabilität der DNA-Doppelhelix durch Berechnung der Freien Energie $G(x)$, die benötigt wird, um ein Basenpaar an jeder Position x der DNA-Sequenz zu trennen (Überblick in Winkelmann et al., 2006). Das ermöglicht die Identifizierung jener Loci, die bei der Entstehung negativer Superhelizität zur Strangtrennung neigen. Bei der Berechnung dieses Strangtrennungspotentials wird auch der Einfluss der benachbarten DNA-Sequenzen mit einbezogen (Kompetitionsprinzip).

S/MAR-Elemente werden artübergreifend erkannt, was auf eine lebenswichtige Funktion für eukaryotische Zellen hindeutet. Durch ihre Verankerung an der Kernmatrix ermöglichen sie die Entstehung topologisch voneinander unabhängiger Domänen. Veränderungen der Superhelizität breiten sich beispielsweise nicht über die Grenzen einer solchen Domäne hinaus aus (Zehnbaumer & Vogelstein, 1985). Die

Fähigkeit zum Auffangen topologischer Veränderungen wird mit der hohen Tendenz zur Strangtrennung in diesen Elementen erklärt. Sie könnte ein wichtiger Faktor in Transkriptionsprozessen sein, bei denen während des Fortschreitens der Polymerase vor dem Enzym eine Welle positiver Superhelizität erzeugt wird (Bode et al., 1996 und 2000a).

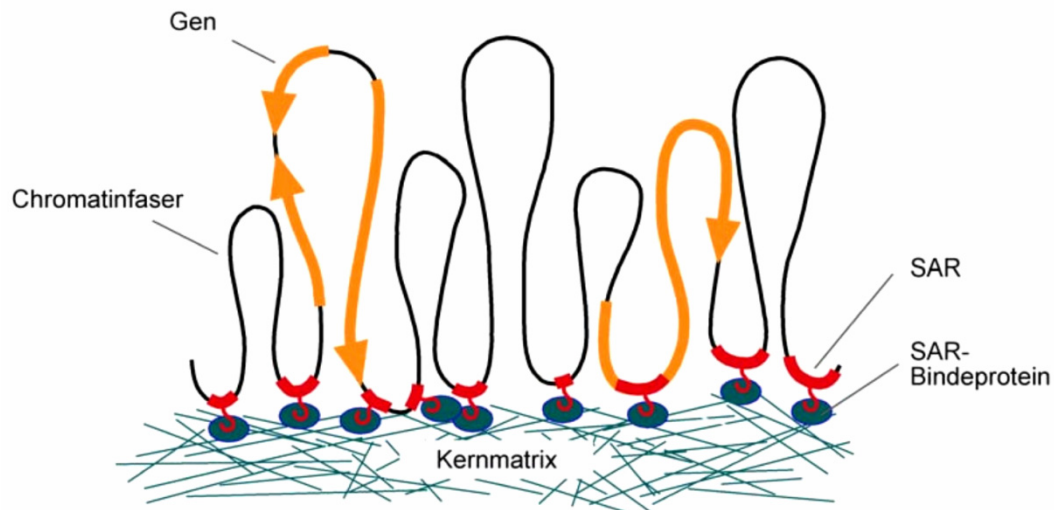


Abb. 1.3: Modell der Organisation des Chromatins

Das Chromatin ist nach diesem Modell in Schleifen organisiert, die an ihrer Basis über spezielle DNA-Sequenzen (S/MAR-Regionen) und S/MAR-bindende Proteine mit der Kernmatrix verbunden sind. Jede Schleife stellt eine unabhängige funktionelle Einheit dar (aus Fackelmayer, 2000).

Allerdings zeigte sich in Transfektionsversuchen, dass ein transkriptionsfördernder Effekt von S/MARs erst eintritt, wenn das Transgen eine geordnete Chromatinstruktur eingenommen hat, also nur nach einer oder mehrerer Replikationsrunden (Schübeler et al., 1996). Dies gilt sowohl für den Fall einer Integration in das Genom der Wirtszelle als auch für replizierende Episomen (Stief et al., 1989; Klehr et al., 1991 und 1992; Hörtnagel et al., 1995; Bode et al., 1998) und unterscheidet S/MARs von Enhancern, die auch in transienten Expressionsexperimenten wirken (Schübeler et al., 1996; Ehrhardt et al., 2003). In Untersuchungen zur Expressionsstärke von Transgenen in Abhängigkeit vom Integrationsort konnte gezeigt werden, dass S/MARs durch ihrer Lokalisation an den Domänengrenzen eine Isolator-Funktion ausüben, indem sie die Einflüsse des umgebenden Chromatins auf die Transkription abschirmen (Namciu et al., 1998; Götze et al., 2005).

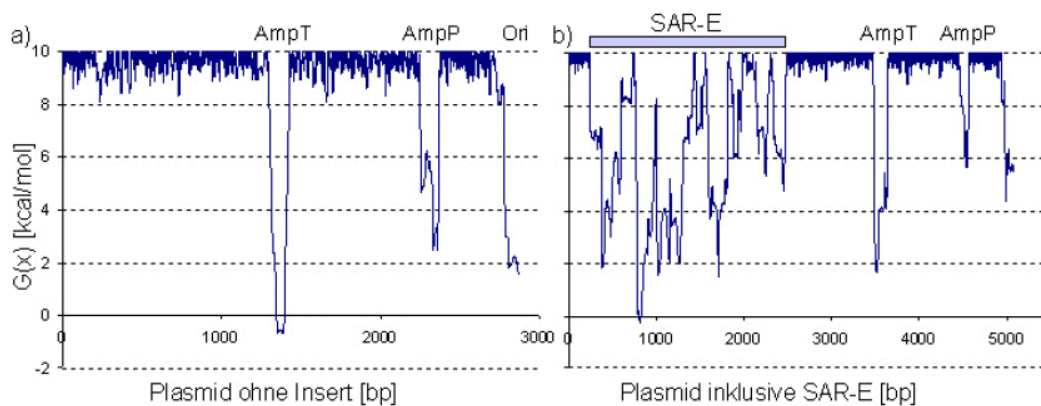


Abb. 1.4: Stress-induced duplex destabilization (SIDD)-Profil eines Vektors (a) ohne und (b) mit S/MAR

Die freie Enthalpie $G(x)$ ist über der Sequenz aufgetragen. Je niedriger der Wert G ist, desto leichter kann es in diesen Bereichen zur Ausbildung von DNA-Einzelsträngen kommen. Das Vektorrückgrat des Plasmids im hier abgebildeten Beispiel ist in den meisten Bereichen stabil. Im leeren Vektor sind Ampicillin-Promotor und -Terminator durch destabilisierte Peaks zu erkennen (a). Durch das starke Destabilisierungspotential der SAR E wird diese Neigung zur Einzelstrangbildung jedoch verringert (b) (aus Götze, 2003).

S/MAR-Elemente sind außerdem mit Mechanismen assoziiert, welche den Kondensationsgrad des Chromatins beeinflussen. Beispielsweise interagiert das S/MAR-bindende Protein SAF-A mit einer Histonacetyltransferase (Martens et al., 2002), welche eine für Transkriptionsfaktoren zugängliche Chromatinstruktur fördert. S/MARs können zudem eine *de novo* Methylierung verhindern, welche über MeCP2 Histondeacetylasen rekrutiert und als erster Schritt der Ausbildung einer reprimierenden Chromatinstruktur angesehen wird (Razin, 1998), wodurch ebenfalls eine stabile Langzeitexpression eines Gens ermöglicht wird (Dang et al., 2000). Auch das Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1), das mit der Kernmatrix und S/MAR-Elementen assoziiert vorliegt und eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Strangbrüchen spielt (Vidakovic et al., 2005), kann über die ADP-Ribosylierung von Histonen eine Auflockerung des Chromatins bewirken (Gluch et al., 2008)

Auch für die Replikation, also der Verdoppelung des Genoms in der S-Phase des Zellzyklus, spielen S/MARs eine wichtige Rolle. Eukaryotische Replikationsstartpunkte (*origins of replication*) stimmen häufig in ihren Sequenzeigenschaften mit denen von S/MAR-Elementen überein oder sind mit diesen kolokalisiert (Amati & Gasser 1990; Dijkwel & Hamlin, 1995; Bode et al., 2001). Für *origins of replication* wurde ebenfalls gezeigt, dass diese permanent mit der Kernmatrix assoziiert sein können (Carri et al., 1986). Möglicherweise dienen S/MARs also auch als Replikationsstartpunkt (Boulikas, 1995).

Eines der ersten S/MAR-Elemente, das umfassend charakterisiert wurde, war die sogenannte SAR E des humanen Interferon- β -Genclusters. Dieses circa 2000 bp umfassende S/MAR-Element liegt am 5'-Ende des humanen Interferon- β -Gens

(IFNB1) etwa 1,7 kb von der kodierenden Region entfernt (Bode und Maass, 1988). Mit dem SAR E sind unter anderem ein starkes Kernmatrix-Bindungsverhalten (Mielke et al., 1990), DNase I Hypersensitivität (Bode et al., 2000a) und eine erhöhte Transgenexpression in Transfektionsexperimenten assoziiert (Mielke et al., 1990; Klehr et al., 1991). Biochemische Analysen zeigen, dass die SAR E ein hohes Potential zur Einzelstrangbildung besitzt (Mielke et al., 1990; Bode et al., 1992), welches auch im SIDD-Profil reflektiert wird (Götze, 2003).

1.2 Der Zellzyklus

Eine Zelle vermehrt sich durch die Verdoppelung ihres Genoms mit anschließender Zweiteilung. Dieser geordnete Vorgang wird Zellzyklus genannt. Während der S-Phase (Synthese-Phase), die etwa die Hälfte der Dauer des Zellzyklus ausmacht, wird die DNA verdoppelt. Danach markiert die Chromosomenkondensierung den Beginn der sogenannten M-Phase (Mitose-Phase), in der die Chromosomentrennung und die Zellteilung erfolgen. In den meisten Zellzyklen sind zusätzliche Lücken, die G- oder *Gap*-Phasen eingeschoben. Zwischen der M-Phase und der S-Phase liegt die sogenannte G₁-Phase, zwischen S-Phase und Mitose die G₂-Phase (Abbildung 1.5). G₁, S und G₂ werden gemeinsam als Interphase bezeichnet. Die beiden Gap-Phasen geben der Zelle die Möglichkeit zu wachsen, beinhalten jedoch auch wichtige Kontrollpunkte: Sind die Umweltbedingungen ungünstig, erfährt die Zelle etwa genotoxischen Stress, oder wurde eine Zellzyklusphase nicht ordnungsgemäß abgeschlossen, kann die Zelle beispielsweise die G₁-Phase verlängern oder in einen Ruhezustand, die G₀-Phase wechseln (Hartwell und Weinert, 1989).

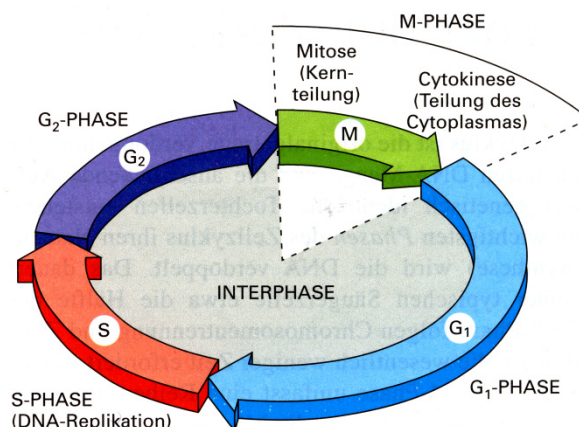


Abb. 1.5: Der Zellzyklus

Schematische Darstellung des Zellzyklus in eukaryotischen Zellen. In der M-Phase finden Mitose und Zytokinese statt, während der Interphase wächst die Zelle. Die Interphase ist unterteilt in die Synthesephase (S) und die *Gap*-Phasen G₁ und G₂ (aus Alberts, Molekularbiologie der Zelle).

Die Hauptkomponente des Zellzykluskontrollsystems bilden die Zyklin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs). CDKs werden durch die Zykline reguliert, deren Aktivität im Laufe des Zellzyklus gewissermaßen oszilliert. Durch diese periodischen Schwankungen im Auf- und Abbau der Zyklin-CDK-Komplexe werden Zellzyklusvorgänge gestartet (Überblick in Nigg, 1995). Die Initiation der Replikation wird unter anderem durch die Konzentration des Proteins Cdc6 gesteuert. Diese steigt in der frühen G1-Phase an und Cdc6 bindet an den Ursprungserkennungskomplexen, den ORCs (*origin recognition complexes*) der Replikationsstartpunkte (*origins of replication*). So können wiederum die Mcm-Proteine binden, die mit den anderen Komponenten den präreplikativen Komplex (pre-RC) bilden. Durch den S-Phase-Zyklin-CDK-Komplex (S-CDK) wird Cdc6 abgelöst, was zum Zerfall des pre-RCs führt und so eine Doppelreplikation verhindert, und schließlich die Replikation gestartet. Das aktive Euchromatin wird früh in der S-Phase, das periphere Heterochromatin eher spät repliziert (O'Keefe et al., 1992). In der anschließenden G2-Phase ist die Zelle mit zwei Kopien des Genoms ausgestattet. Vor dem Eintritt in die Mitose liegt ein weiterer Kontrollpunkt, der die vollständige Replikation gewährleistet.

1.3 Gentherapie

Unter Gentherapie versteht man das Einbringen von Genen in die Körperzellen des Patienten zu einem therapeutischen Zweck, wie der Heilung oder Linderung von Krankheiten. Dieser Vorgang wird Gentransfer genannt und ist in Deutschland auf somatische Zellen beschränkt (somatische Gentherapie). Die Keimbahntherapie, also die Modifikation von Ei- oder Samenzellen und deren Vorläuferzellen, ist durch das Embryonenschutzgesetz verboten. Das Vehikel, welches das therapeutische Gen trägt, ist der sogenannte Vektor. Zellen können *in vivo*, also direkt im menschlichen Körper, z.B. durch eine Injektion des Vektors in den Muskel, oder *ex vivo* behandelt werden. Hierzu werden die Zielzellen, in der Regel die des blutbildenden Systems, aus dem Körper isoliert, mit dem Vektor genetisch modifiziert, gegebenenfalls angereichert und dem Patienten wieder zugeführt.

Der erste dokumentierte Versuch einer Gentherapie fand 1990 statt und wurde an einem vierjährigen Mädchen durchgeführt, das an Adenosindeaminase-Defizienz, einem schweren kombinierten Immundefizienzsyndrom (ADA-SCID), litt. Seither wurden weltweit 1472 (Stand September 2008) klinische Studien zu gentherapeutischen Zwecken durchgeführt oder eingeleitet. Während zunächst davon ausgegangen wurde, vor allem monogenetische Krankheiten wie etwa die X-chromosomal-rezessiv vererbte Muskeldystrophie vom Typ Duchenne oder auch SCID (*severe combined immunodeficiency*) mittels Gentherapie behandeln zu können, ist die Indikation bei über 65% der klinischen Studien zur Gentherapie mittlerweile eine Krebserkrankung. Nur in 8,3% der Studien wird eine monogenetische Erkrankung behandelt (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

1.3.1 Virale Vektoren in der Gentherapie

Viele Bemühungen, zu therapeutischen Zwecken Gene in Zellen einzuschleusen, stützen sich auf diverse modifizierte Viren (Überblick in Thomas et al., 2003). Auf replikationsdefizienten Retroviren basierende Vektoren etwa führen durch eine stabile Integration in das Wirtsgenom zu einer dauerhaften Expression des Transgens. Durch diese Integration vektorieller Sequenzen kann es jedoch zu einer Insertionsmutagenese kommen. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass retrovirale Vektoren Leukämie induzieren können (Li et al., 2002; Baum et al., 2004; Modlich et al., 2005). Es wurden leider auch Zwischenfälle bei Therapien am Menschen bekannt (Marshall et al., 2001). Als Durchbruch erschien zunächst die erfolgreiche Gentherapie ab dem Jahr 2000 bei 17 von 20 Kindern, deren angeborene Immunschwächekrankheit SCID-XI (*X-linked severe combined immunodeficiency*) mittels retroviraler Vektoren behandelt worden war. Diese Krankheit wird durch Mutationen im Interleukinrezeptor-gamma-C-Ketten-Gen (γc) verursacht. Den Patienten wurden hämatopoetische Stammzellen entnommen und *ex vivo* mit den für das korrekte γc -Gen kodierenden Retroviren transduziert, im Anschluss wurden die Zellen wieder transplantiert. Die Kinder entwickelten eine normale Immunabwehr mit γc -genkorrigierten T- und NK (Natürliche Killer)-Lymphozyten. Zwei Jahre nach der Behandlung traten erste Leukämiefälle bei den so behandelten Kindern auf. Insgesamt erkrankten in den folgenden Jahren fünf Kinder, eines starb (Check, 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Kaiser, 2003; Woods et al., 2006; Cole, 2008). Das Auftreten der ersten Leukämiefälle führte in den USA, Frankreich und Deutschland zunächst zu einem Stopp der klinischen Studien, bei denen Retroviren für den Gentransfer in blutzellbildende Stammzellen verwendet wurden (Williams und Baum, 2003; Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Kaiser, 2003). Ursache für die klonale T-Zell-Proliferation war die Aktivierung des Onkogens *LIM domain only 2* (LMO-2), in dem bzw. in dessen Nähe der retrovirale Vektor integriert hatte (Nam und Rabbitts, 2006).

Vektorsysteme, die auf replikationsdefizienten Adenoviren basieren, integrieren nicht, sondern liegen extrachromosomal in einer Wirtszelle vor und erreichen eine hohe Transgenexpression, allerdings bleibt diese nur über einen kurzen Zeitraum stabil (Engelhardt et al., 1993). Wiederholte Infektionen sind notwendig, was aber wiederum zu einer starken Immunreaktion des Wirtsorganismus führen kann (Yang et al., 1994). Im Jahre 1999 starb ein junger Mann bei einer klinischen Studie an multiplem Organversagen, hervorgerufen durch die massive Immunantwort seines Körpers auf die Injektion eines adenoviralen Vektors (Marshall, 1999).

Aufgrund der beschriebenen Nachteile und Gefahren viraler Vektorsysteme wurden weitere Vektoren für den Einsatz in der Gentherapie entwickelt. Sie basieren auf sogenannter „nackter DNA“, die zum Beispiel in Liposomen verpackt in die Zellen eingebracht wird, was im Gegensatz zu einer Virusinfektion relativ ineffizient ist. Die weiterentwickelten Vektoren beruhen auf einem viralen Plasmidreplikon, wie dem des Epstein-Barr-Virus (EBV; Gahn und Schildkraut, 1989) oder des Simian Virus 40 (SV40; Fanning und Knippers, 1992), das die stabile, episomale Replikation in

der Zielzelle ermöglicht. In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um den viralen Replikationsursprung und um ein virales, transaktivierendes Protein, das an diesen Replikationsursprung binden kann und so die Replikation des Vektors während des Zellzyklus und seine gleichmäßige Verteilung auf die Tochterzellen während der Mitose bewirkt. Allerdings besitzen diese Vektoren ein enges Wirtsspektrum. Das Plasmidreplikon des Simian Virus 40 (Affenvirus 40) beispielsweise bewirkt nur in Primatenzellen eine episomale Replikation von Vektoren (Wessel et al., 1992). In anderen Säugetierzellen, zum Beispiel Hamsterzellen, findet keine Replikation am SV40-Replikationsursprung statt (Fanning und Knippers, 1992). Das Plasmidreplikon besteht aus dem SV40-Replikationsursprung und einem Gen, welches das transaktivierende Large T-Antigen kodiert. Dieses Protein bindet als Hexamer an den Replikationsursprung und entwindet die DNA durch seine Helikaseaktivität, wodurch die Replikation durch die zelluläre Primase eingeleitet werden kann (Wessel et al., 1992). Zudem kann das Large T-Antigen direkt an das Chromatin und die Kernmatrix binden und vermittelt so die mitotische Stabilität des Vektors (Schirmbeck und Deppert, 1987 und 1991). Transaktivierende Proteine wie das Large T-Antigen haben onkogene Eigenschaften, was eine Anwendung in der Gentherapie und Biotechnologie unterbindet (Cooper et al., 1997) und können außerdem einen immunogenen Einfluss haben (Chen et al., 1999).

1.3.2 Nicht-virale Alternativen: Von der Plasmid-DNA zu *Minicircles*

Plasmide sind ringförmige DNA-Moleküle und natürlicherweise Teil der Erbinformation von Bakterien. Isolierte Plasmid-DNA liegt zu unterschiedlich großen Anteilen in drei topologischen Zuständen vor (Abbildung 1.6), nämlich linear, offenkettig-zirkulär (*open-circular* (oc) oder kovalent geschlossen-zirkulär (*supercoiled* (sc) bzw. *covalently closed circles* (ccc)).

Der Einsatz nackter Plasmid-DNA, sogenannter pDNA-Vektoren, für gentherapeutische Fragestellungen wurde *in vivo*, etwa im Mausmodell, aber auch in klinischen Studien am Menschen erprobt. Im September 2008 waren 373 klinische Studien mit nackter Plasmid-DNA oder DNA-Lipid-Komplexen genehmigt, im Gange oder bereits abgeschlossen, das entspricht 25,3% aller gentherapeutischen klinischen Studien (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

Aufgrund der mitotischen Instabilität dieser Vektoren bleibt ihr Einsatz auf bestimmte Organe wie Leber, Skelettmuskel oder die Haut beschränkt. Hepatocyten etwa leben normalerweise ein Jahr lang und werden nur langsam erneuert. Dennoch nimmt die Transgenexpression bereits nach einigen Tagen ab (Herweijer et al., 2001). Es zeigte sich bei Versuchen in der Maus, dass der prokaryotische Vektoranteil, das Plasmidrückgrat, einen negativen Einfluss auf die stabile Transgenexpression ausübt. Der genaue Mechanismus dieser repressiven Wirkung ist noch nicht vollständig geklärt. Prokaryotische Sequenzen weisen einen mindestens zwanzigmal höheren Anteil an nicht-methylierten CpG-Motiven auf als

Vertebraten-DNA. Solche CpG-Abschnitte können in Säugerzellen *de novo* methyliert werden und so zu einer Inaktivierung des Transgens führen (Hong et al., 2001; Chevalier-Mariette et al., 2003). Außerdem haben diese CpG-Motive eine immunogene Wirkung und können beispielsweise Makrophagen aktivieren, eine Entzündungsreaktion stimulieren und die Antikörperproduktion von B-Zellen steigern (Übersicht in Scheule, 2000). Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Methylierung von CpG-Motiven *in vivo* keinen signifikanten Effekt auf das Transgen-*silencing* hat (Chen et al., 2008). Die Ursache scheint aber dennoch in der kovalenten Verknüpfung bakterieller Sequenzen mit der Expressionskassette zu liegen (Chen et al., 2003 und 2004; Riu et al., 2005). Chen et al. zeigten 2007, dass die Plasmid-DNA durch Histonmodifikationen (beispielsweise eine Methylierung des Lysin 9 von Histons H3) Heterochromatin-ähnliche Strukturen ausbildet. Ausgangspunkt sind bei diesem Vorgang die prokaryotischen Vektoranteile, dann erfolgt die Ausbreitung des Heterochromatins (*spreading*) und somit eine Stilllegung des Transgens (Chen et al., 2008). Flankiert man das Transgen durch zwei sog. Insulatoren (wie der DNase I hypersensitiven Site 4 aus dem 5' Bereich des β -Globin-Genclusters des Huhns, cHS4), bleibt die Transgenexpression deutlich länger stabil.

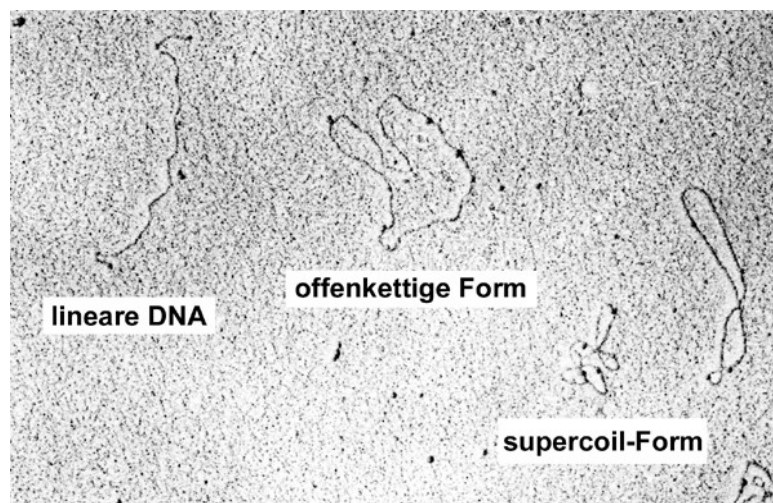


Abb. 1.6: Topologische Struktur von Plasmid-DNA

Elektronenmikroskopische Aufnahme von linearer, offenkettig-zirkulärer (oc) und kovalent geschlossen-zirkulärer Plasmid-DNA (sc bzw. ccc) (<http://de.wikipedia.org/wiki/Plasmid>).

Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* zeigten, dass durch das Trennen der Expressionskassette vom Plasmidrückgrat die Expression, verglichen mit der ursprünglichen Plasmid-DNA, um ein Vielfaches erhöht und verlängert wird (Darquet et al., 1997 und 1999; Chen et al., 2003, 2004, 2007 und 2008 sowie Riu et al., 2005). Zirkuläre Vektoren sind hierbei aufgrund der höheren Stabilität und Expression der Transfektion der eukaryotischen Expressionskassette in Form

linearer DNA vorzuziehen, zudem ist die Gefahr der Integration in sich teilende Zellen für zirkuläre Vektoren geringer (Chen et al., 2003).

Mittels ortsspezifischer intramolekularer Rekombination, entweder in Rekombinase-exprimierenden *E. coli*-Stämmen oder direkt *in vivo*, können solche zirkulären DNA-Moleküle aus Plasmid-DNA erzeugt werden. Die so entstandenen Vektoren ohne prokaryotische Sequenzen und Selektionsmarker werden *Minicircles* genannt. Das Edukt der Rekombinationsreaktion wird hierbei als Parentalplasmid bezeichnet, die Produkte sind der gewünschte *Minicircle* und das Miniplasmid, das aus dem bakteriellen Plasmidrückgrat inklusive Selektionsmarkern besteht (Darquet et al., 1997 und 1999; Chen et al., 2003 und 2005).

Die Anwendung von *Minicircle*-DNA, beispielsweise zur Behandlung der koronaren Herzerkrankung, wurde im Tiermodell erprobt. Hierbei wurde ein *Minicircle*-Vektor, der für den angiogenen Wachstumsfaktor VEGF kodiert, mit dem pDNA-Vektor phVEGF165 verglichen, der bereits in klinischen Studien am Menschen verwendet wird. Es zeigten sich überlegene Expressionseigenschaften des *Minicircle*-Vektors sowohl im Skelett- als auch im Herzmuskel (Stenler et al., 2009).

Obwohl bereits vor über zehn Jahren erstmals die Produktion und Anwendung eines *Minicircle*-Vektors veröffentlicht wurde (Darquet et al., 1997), gab es bislang nicht die Möglichkeit, *Minicircle*-DNA im industriellen Maßstab herzustellen. Die Rekombination der DNA in F1p- und Cre-exprimierenden *E. coli*-Stämmen führt zudem zu einem gewissen Anteil von Multimeren in der *Minicircle*-DNA (Nehlsen et al., 2006; Bigger et al., 2001). Erst 2008 wurde von Mayrhofer et al. ein im industriellen Maßstab durchführbares *Minicircle*-Produktionsverfahren publiziert. Diese sogenannte RBPS (*recombination based plasmid separation*)-Technologie besteht aus zwei Schritten: Zunächst werden durch intramolekulare Rekombination des Parentalplasmids mittels der ParA-Resolvase *Minicircle* und Miniplasmid voneinander getrennt. Anschließend wird die *Minicircle*-DNA über eine Protein/DNA-Affinitätschromatografie aufgereinigt. Die so hergestellte DNA besteht zu knapp 99% aus *supercoiled Minicircle*-Monomeren.

Mit den kürzlich vorgestellten Plasmiden ohne Antibiotikumresistenzgenen, sogenannten pFAR-Plasmiden (*plasmids Free of Antibiotic Resistance genes*; Marie et al., 2008), kann man die Rekombination in Bakterien und die damit verbundene aufwendige Aufreinigung der Vektor-DNA zwar vermeiden, diese Konstrukte besitzen aber noch einen bakteriellen Replikationsursprung, sind also keine echte Alternative zum *Minicircle*-Konzept (siehe auch 3.1).

1.3.3 pEpi – ein episomal replizierendes Plasmid zum nicht-viralen Gentransfer

Die intensive Suche nach einer sicheren, nicht-viralen Alternative zum stabilen Gentransfer in sich teilende Zellen führte schließlich zu der Entwicklung des episomal replizierenden Plasmids pEpi (Abbildung 1.7; Piechaczek et al., 1999). Es enthält, wie alle seine Derivate der ersten Generation, den viralen Replikationsursprung des SV40, der allerdings nicht zur Replikation des Plasmids benötigt wird (Jenke et al., 2004) und eine S/MAR-Sequenz aus der 5'-Region des humanen Interferon- β -Gens, die sogenannte SAR E (siehe auch 1.1.3). Dieses S/MAR-Element rekrutiert die Komponenten des zellulären Replikationsapparates und macht so das transaktivierende *Large T*-Antigen überflüssig. Die S/MAR agiert dabei als chromosomale Haftsequenz („*molecular glue*“) durch Interaktion mit dem ubiquitären Protein SAF-A (Jenke et al., 2002). SAF-A, ein regulatorisch wirksames und strukturgebendes Protein der Kernmatrix, hat eine hohe Affinität zu der S/MAR-Sequenz SAR E.

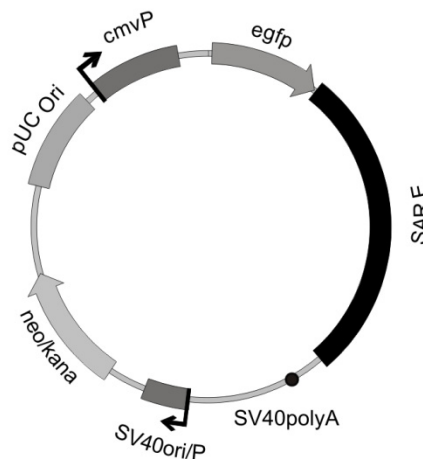


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des Vektors pEpi

Der Vektor enthält eine Transkriptionseinheit, bestehend aus dem cmv-Promotor und einem eGFP-Reportergen. Die SAR E aus dem Bereich der 5'-Region des humanen Interferon- β -Gens schließt sich daran an. Eine SV40-Polyadenylierungsstelle befindet sich 3' des S/MAR-Elements. Der SV40-Promotor/*origin of replication* dient der Transkription des Selektionsmarkers Neomycin-Phosphotransferase, der eine Resistenz gegenüber G418 und Kanamycin vermittelt. Der pUC19 *origin of replication* sorgt für die Vermehrung des Plasmids in *E. coli*. Nicht aufgeführt ist die HSV-TK-Polyadenylierungsstelle zur Transkription des *neo/kana*-Gens in Eukaryoten.

Diese Bindung des Vektors an der Kernmatrix vermittelt nach seiner Replikation die gleichmäßige Verteilung an die Tochterzellen bei der Mitose. Es konnte gezeigt werden, dass der Vektor mit mitotischen Chromosomen im Zellkern assoziiert vorliegt (Baiker et al., 2000). Die Replikation erfolgt geordnet einmal pro Zellzyklus und früh in der S-Phase. Es wurde gezeigt, dass Mitglieder des pre-RCs an den

Vektor binden können und eine funktionelle Rolle bei seiner Replikation spielen. Die Bindungsstellen des *origin recognition complex* (ORC) sind dabei über den gesamten Vektor verteilt (Schaarschmidt et al., 2004). Die Startstellen für die Replikation werden also, wie in Säugerzellen üblich, nicht durch die DNA-Sequenz, sondern durch epigenetische Faktoren, wie die Konformation des Chromatins und spezifisch gebundene Transkriptionsfaktoren, bestimmt.

Für die stabile Replikation des Vektors ist eine aktive Transkription des Reportergens *upstream* der S/MAR, die bis in die S/MAR ablaufen muss, erforderlich (Stehle et al., 2003; Nehlsen, 2004). Die DNA-Polymerase II verursacht möglicherweise durch Strangtrennung dieser BUR (*base unpairing region*) eine Konformationsänderung des Vektors und erlaubt so die anschließende Bindung des ORCs. Die stabile episomale Replikation wurde bereits für verschiedene Zelllinien bestätigt, wie beispielsweise die biotechnologisch bedeutende Hamsterzelllinie CHO-K1 (Piechaczek et al., 1999) und die humanen Zelllinien HaCat (Keratinocyten, Schaarschmidt et al., 2004) und HeLa (Epithelzellen, Jenke et al., 2004). Papapetrou et al. zeigten 2005, dass pEpi-Vektoren in humanen hämatopoetischen CD34+ Progenitorzellen episomal repliziert werden. Der klinischen Anwendung dieses episomal replizierenden Vektors steht allerdings die Notwendigkeit eines initialen Selektionsdrucks im Wege. Transfizierte Zellen müssen mindestens zwei bis drei Wochen mit G418 selektiert werden, um den Vektor zu etablieren. Nach dieser initialen Selektion ist es möglich, die Zellen ohne Selektionsdruck zu kultivieren. Allerdings wurde in einigen der getesteten Zelllinien nach längerer Kultivierung ein Rückgang der Transgenexpression bzw. des Anteils exprimierender Zellen, sowohl durch Vektorverlust durch Erliegen der Transkription als auch im Zusammenhang mit Histon-Hypoacetylierung beobachtet (Nehlsen et al., 2006; Papapetrou et al., 2005; Nehlsen, 2004). Zudem ist ein initialer Selektionsdruck mit G418 *in vivo* nicht möglich und ist insbesondere bei einer *ex vivo* Transfektion, etwa von hämatopoetischen Stammzellen, mit anschließender Re-Implantation nicht anwendbar. Dieses Problem wurde durch die Weiterentwicklung von pEpi zu einem S/MAR-basierten *Minicircle*-Vektor gelöst (diese Arbeit; Nehlsen et al., 2006).

1.4 Sequenzspezifische Rekombination und das Flp/FRT-System

Unter Rekombination versteht man die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA-Strängen in einer lebenden Zelle. Allgemeine Rekombination tritt zwischen DNA-Segmenten mit weitreichender Homologie auf und wurde erstmals 1964 von Holliday beschrieben. Ortsspezifische Rekombination (*site specific recombination*) findet zwischen zwei kurzen, genau definierten DNA-Sequenzen (*sites*) statt und wird zur Genommodifikation in ES-Zellen, transgenen Mäusen, Zelllinien, Pflanzen, Hefe und *Drosophila* eingesetzt (Übersicht in Bode et al., 2000b).

Das Flp/FRT-System aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gehört zu den am häufigsten verwendeten Rekombinationssystemen. Die meisten Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* enthalten das sogenannte 2 μ -Plasmid, welches in hoher Kopienzahl vorkommt (Hartley und Donelson, 1980). Dieses 6318 bp große Plasmid ist durch zwei invertierte Sequenzwiederholungen in zwei Bereiche getrennt. Innerhalb dieser *repeats* befindet sich je eine Erkennungsstelle für die vom Plasmid kodierte, 43 kDa große Flp-Rekombinase („flip-flop-Inversionsmechanismus“, Broach und Hicks, 1980). Die 48 bp umfassenden Erkennungssequenzen werden als FRT-sites (*Flp Recognition Target*) bezeichnet. Die ortsspezifische Rekombination zwischen diesen Erkennungsstellen durch die Flp-Rekombinase führt zur Entstehung verschiedener Plasmidkonkatemere bei der Replikation. Diese werden anschließend durch homologe oder Flp-vermittelte Rekombination in Monomere zerlegt (Volkert et al., 1989). Eine FRT-site besteht aus einer 8 bp langen, asymmetrischen *spacer*-Region, welche die Orientierung der Erkennungssequenz vorgibt, drei 13 bp langen Sequenzwiederholungen, die als Bindungsstellen für die Flp-Rekombinase dienen, sowie einem zusätzlichen Basenpaar. Die dritte Sequenzwiederholung erhöht die Rekombinität, ist aber für die Exzisionsreaktion entbehrlich (Senecoff und Cox, 1986). Das Flp/FRT-System wird in *E. coli*, *Drosophila* sowie in Pflanzen- und Säugerzellen angewendet (Übersicht in Kilby et al., 1993). Von FRT-Erkennungsstellen flankierte Genabschnitte, wie Selektionsmarker, können exziiert (Fiering et al., 1993) oder Sequenzen über singuläre FRT-sites integriert werden (Schübeler et al., 1998), wobei allerdings die Exzision die thermodynamisch günstigere Reaktion ist. In der vorliegenden Arbeit wurde der Flp-exprimierende *E. coli*-Stamm MM294 Flp (Buchholz et al., 1996) zur Beseitigung der prokaryotischen Vektoranteile des Plasmids pEpi und somit zur Produktion von S/MAR-basierten *Minicircle*-Vektoren genutzt (siehe auch Nehlsen et al., 2006).

1.5 Aufgabenstellung

Nicht-virale episomal replizierende Vektoren auf der Grundlage eines S/MAR (*scaffold/matrix attachment region*)-Elements gelten als ein Meilenstein auf der Suche nach sicheren Alternativen für die Gentherapie. Der Prototyp eines solchen Vektors, das Plasmid pEpi, erfordert zu seiner Etablierung in der Zelle allerdings initialen Selektionsdruck, der eine klinische Anwendung ausschließt. In verschiedenen Zelltypen unterliegt pEpi epigenetischen Inaktivierungsmechanismen, die zum Rückgang der Transgenexpression und, in teilenden Zellen, zum Verlust führen.

Eine Teillösung dieser Probleme verspricht die Entfernung der prokaryotischen Plasmidsequenzen einschließlich des Selektionsmarkers (*Minicircle*- und pFAR-Prinzipien). Beide Konzepte wurden in der Vergangenheit an nicht autonom replizierenden Vektoren realisiert, wobei die grundsätzliche Richtigkeit des Ansatzes eindrucksvoll belegt werden konnte. Replizierende *Minicircles*, d.h. zur Modifikation teilender Zellen geeignete Varianten, wurden hingegen bisher nicht beschrieben.

Während die Herstellung eines replizierenden *Minicircles* in der vorausgegangenen Diplomarbeit realisiert werden konnte, hat diese Promotionsarbeit zunächst das Ziel, den auf pEpi-basierenden *Minicircle*-Vektor bezüglich seiner Expressionseigenschaften zu charakterisieren. Diese beinhalten, ausgehend von der Transfektion und der Etablierung in der Kernarchitektur, die episomale Stabilität, Transkription, mRNA-Prozessierung und Translation. Damit soll eine Grundlage für die biotechnologische und gentherapeutische Anwendung dieses Minimalvektors geschaffen werden. Die Produktion derartiger Vehikel und ihre Anwendung zur Herstellung von DNA-Vakzinen sowie nicht-destruktiver Vektoren für den vielfältigen Einsatz in der Transgenese, Gentherapie und Biotechnologie, stößt auf immenses gegenwärtiges Interesse. Diese Tatsache führte zur Kooperation mit einer Firma, die auf der Grundlage unserer Ergebnisse erstmalig die großtechnische Produktion hochreiner replizierender *supercoiled Minicircles* realisieren konnte.

Wie unsere Ergebnisse zeigen, hängt die Etablierung S/MAR-basierter Vektoren in der Wirtszelle von den Gegebenheiten der Kernarchitektur und damit möglicherweise von der Zellzyklus-Phase und/oder dem Chromatin-Status zum Zeitpunkt der Transfektion ab. Grundlegende Studien adressieren die Zusammenhänge zwischen der Transfektions- und Etablierungseffizienz. Ein weiterer wichtiger Parameter ist die mRNA-Prozessierung: Episomale Persistenz hängt nicht nur von der Gegenwart des S/MAR-Elements ab, die eine authentische Segregation ermöglicht, sie beinhaltet auch die Öffnung dieser BUR (*base-unpairing region*) durch aktive Transkription. Eine eher unerwünschte Folge davon kann die Verlängerung der mRNA um nicht- oder fehl-codierende Basen-Triplets darstellen. Um diesem Phänomen näherzukommen und letztlich Abhilfe schaffen zu können, sollen Vektor-Derivate unterschiedlicher Expressionsleistung und –stabilität hinsichtlich ihrer transkriptionellen Termination und ihrer Polyadenylierungseigenschaften untersucht werden.

2. Ergebnisse

2.1 Etablierung eines episomal replizierenden *Minicircle*-Vektors in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien

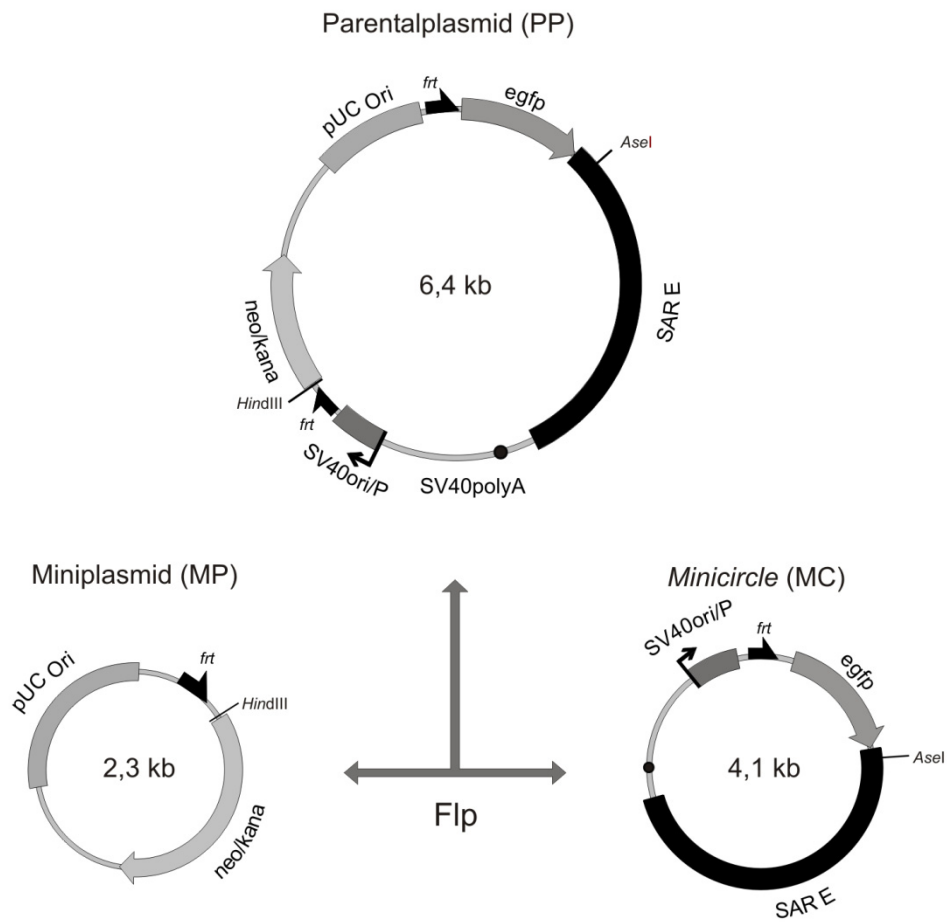
In einer zurückliegenden Arbeit (Diplomarbeit, 2005) wurde die erfolgreiche Herstellung eines *Minicircle*-Vektors gezeigt, der auf einem Derivat des episomal replizierenden Plasmids pEpi beruht. Die ersten Experimente zur Etablierung dieses neuartigen, S/MAR-basierten *Minicircle*-Vektors in den Zelllinien CHO-K1 (*chinese hamster ovary*, transformierte Zellen aus dem Ovarium des chinesischen Hamsters) sowie der immortalisierten Mausfibroblastenzelllinie NIH3T3 deuteten auf überlegene Expressionseigenschaften und höhere episomale Stabilität des *Minicircle*-Vektors im Vergleich zu pEpi-Plasmiden hin. Diese Ergebnisse sollten in der vorliegenden Arbeit zunächst verifiziert werden.

Die Funktionalität und der episomale Status wurden hierzu wiederum in der Zelllinie CHO-K1, der murinen Zelllinie NIH3T3 und der transformierten menschlichen Nierenzelllinie HEK293 (*human embryonic kidney*) mit verschiedenen Methoden überprüft. Da diese Zelllinien eine hohe Teilungsrate aufweisen, kann bei erfolgreicher Langzeitexpression Transgen-*silencing* sowie die für nichtreplizierende Vektoren normalerweise stattfindende „Ausverdünnung“ ausgeschlossen werden. Der *Minicircle*-Vektor wurde mit einem Derivat des Plasmid pEpi verglichen.

2.1.1 Etablierung und Expressionsverhalten der episomal replizierenden Vektoren

Die Herstellung der *Minicircle*-DNA erfolgte wie beschrieben (Nehlsen et al., 2006) durch intramolekulare, Fip-vermittelte Rekombination eines sogenannten Parentalplasmids in einem Fip-Rekombinase exprimierenden *E.-coli*-Stamm. Die Aktivierung der Fip-Rekombinase führt hierbei zur Exzision und somit zur Trennung von *Minicircle* und prokaryotischen Sequenzen (sog. „Miniplasmid“) einschließlich des pUC-*origin of replication* und des Selektionsmarkers. Der *Minicircle* kann somit nicht mehr in *E. coli* repliziert werden (Abbildung 2.1 A). Der cmv-Promotor, unter dessen Kontrolle das eGFP-Gen im Ausgangskonstrukt pEpi-eGFP steht (Abbildung 1.7), ist in pEpi-delCFGSAF deletiert. Erst durch die intramolekulare, Fip-vermittelte Rekombination kommt das eGFP-Gen infolge der Zirkularisierung unter die Kontrolle des SV40-Promotors („*Promotor-Trap*“). Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass eine eventuelle Kontamination der *Minicircle*-DNA mit nichtrekombiniertem Parentalplasmid nach der Transfektion in eukaryotische Zellen nicht in einer eGFP-Expression resultiert.

A



B

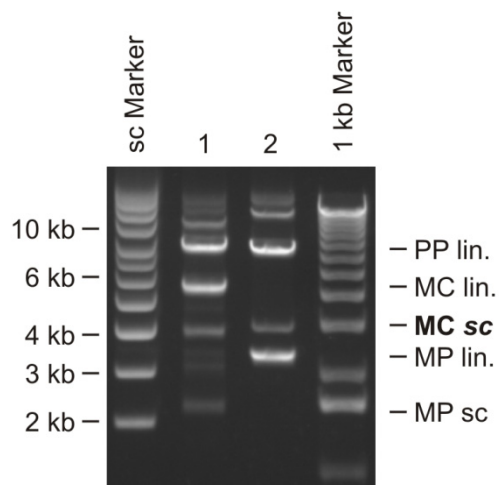


Abb. 2.1: Ortspezifische Rekombination in Flp-exprimierenden *E. coli* und Restriktionsanalyse der Produkte

A: Die Aktivierung der Fli-Rekombinase führt zur intramolekularen Rekombination und zur Trennung von *Minicircle* und prokaryotischen Sequenzen („Miniplasmid“). Die Schnittstellen der zur Restriktionsanalyse eingesetzten Enzyme sind eingezeichnet. Bei dem Parentalplasmid handelt es sich um ein pEpi-Derivat mit deletiertem cmv-Promotor (pEpi-delCFGsARF).

B: Restriktionsanalyse der DNA nach Fli-Induktion mit AseI (1) führt zu Linearisierung des Parentalplasids und des *Minicircles*, das Miniplasmid bleibt *supercoiled*. Es sind deutlich die auftretenden Miniplasmid-Verkettungen zu erkennen. Der Verdau mit HindIII (2) linearisiert Parentalplasmid und Miniplasmid. Der *Minicircle* bleibt *supercoiled*. sc Marker: *supercoiled* DNA-Marker (Invitrogen); Marker: 1kb-Leiter (Gibco); PP: Parentalplasmid; MC: *Minicircle*; MP: Miniplasmid; sc: *supercoiled*; lin.: linearisiert.

Die extrachromosomale DNA der *E. coli*-Zellen enthält nach der Fli-vermittelten Rekombination nichtrekombiniertes Parentalplasmid (pEpi-delCFGsARF), den bakteriellen Vektoranteil (Miniplasmid) und den *Minicircle* sowie Miniplasmid- und *Minicircle*-Verkettungen. Da eine Integrationsreaktion durch die Fli-Rekombinase thermodynamisch ungünstig und daher eher unwahrscheinlich ist, kann das Auftreten dieser Verkettungen möglicherweise dadurch erklärt werden, dass der verwendete *E. coli*-Stamm MM294-Fli (Buchholz et al., 1996) rekombinationskompetent (*recA*+) ist. Die Restriktionsanalyse mit Enzymen, die entweder einmal im Plasmidrückgrat oder in der *Minicircle*-Sequenz schneiden, zeigt nur die für *Minicircle* bzw. Miniplasmid spezifischen Banden, so dass es sich offenbar tatsächlich um Verkettungen und nicht um durch Rearrangements entstandene DNA-Moleküle handelt (Abbildung 2.1 B). Die *supercoiled Minicircle*-DNA wurde anschließend per Gelelektrophorese von dem zuvor linearisierten Parentalplasmid und Miniplasmid getrennt und aufgereinigt (siehe auch Material und Methoden 4.13).

Nach der Lipofektion der verschiedenen Zelllinien mit dem *Minicircle*-Vektor können nach einer Etablierungsphase von fünf bis zehn Generationen (Zellverdoppelungen) stabil eGFP-exprimierende Zellen mittels FACSorting angereichert werden. Abbildung 2.2 zeigt beispielhaft das Expressionsverhalten von transfizierten und fünf Generationen später sortierten CHO-K1-Zellen. Die so erhaltenen Klongemische mit dem *Minicircle*-Vektor sind zu 65% eGFP-positiv. Als Kontrolle wurde das pEpi-Derivat pEpi-FGsARF (schematische Darstellung siehe Abbildung 2.3) eingesetzt. Die eGFP-Expression der sortierten Zellpopulation mit pEpi-FGsARF geht ohne Selektionsdruck mit G418 innerhalb von etwa 14 Tagen vollständig verloren. Durch Selektion kann eine eGFP-exprimierende Subpopulation angereichert werden. Der Anteil exprimierender Zellen erreicht nach 53 Generationen unter Selektionsdruck knapp 60% (Nehlsen et al., 2006). Der Anteil eGFP-exprimierender Zellen der *Minicircle*-Klongemische bleibt über den hier untersuchten Kultivierungszeitraum von 53 Generationen stabil. Der *Minicircle*-Vektor ist folglich ohne Selektionsdruck in einem Teil der transfizierten Zellen etablierbar. Der Vektor pEpi-FGsARF kann dagegen ohne eine Selektion der Zellen mit G418 nicht in CHO-K1-Zellen etabliert werden, sondern erfordert Selektionsdruck. Allerdings muss dieser Selektionsdruck rechtzeitig eingesetzt werden, um dem kompletten Verlust des Vektors vorzubeugen.

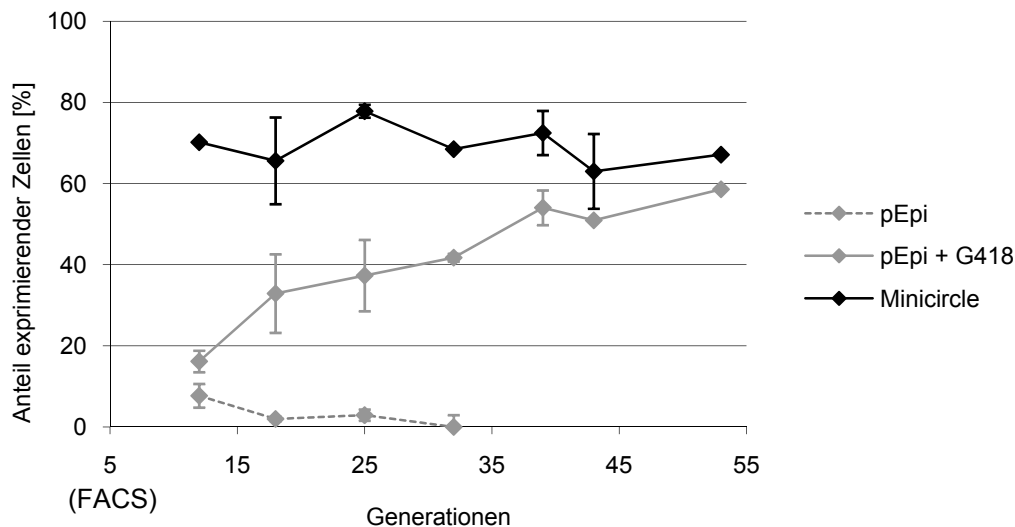


Abb. 2.2: Langzeitexpression replizierender Episomen in CHO-K1-Zellen

Nach einer fünftägigen Etablierungsphase wurden eGFP-exprimierende Zellen mittels FACS angereichert. In regelmäßigen Abständen wurden FACS-Messungen vorgenommen. Dargestellt ist hier der prozentuale Anteil eGFP-exprimierender Zellen über der Zeit (Generationen = Zellverdoppelungen). Ein Teil der sortierten pEpi-Klongemische wurde mit G418 selektiert, was zu allerdings zufälligen Integrationen in das Genom führte, wie die folgenden Daten zeigen (2.1.2).

2.1.2 Untersuchung des episomalen Status durch Southern Blot-Analysen

Für die routinemäßige, vorläufige Überprüfung des episomalen Status der untersuchten Vektoren ist eine Southern Blot-Analyse der Gesamt-DNA die bevorzugte Methode. Die extrahierte Gesamt-DNA wurde hierfür mit Restriktionsenzymen geschnitten, die je nur eine einzige Erkennungsstelle im *Minicircle*-Vektor und im Parentalplasmid pEpi-FGSARF haben (sog. *single cutter*). Die Hybridisierung des Southern Blots mit einer radioaktiv markierten Sonde, die gegen die Vektorsequenzen gerichtet ist, sollte daher nur eine spezifische Bande von der Größe des linearisierten Vektors ergeben und so das zirkulär vorliegende Episom nachweisen (Abbildung 2.3 A).

Einzelstrangbrüche und Kontaminationen mit linearisierter DNA, die z.B. bei der Präparation der *Minicircle*-DNA aus dem Gel entstehen, können zu einer Integration dieser eingebrachten DNA in das zelluläre Genom führen. Dabei besteht die Möglichkeit einer Tandemintegration des Konstrukts. Kommt es hierbei zu einer sogenannten *head-to-tail*-Anordnung, kann mittels PCR nicht mehr zwischen einem Episom und einer Tandemintegration unterschieden werden, da in beiden Fällen der gesamte Vektor amplifiziert wird. Auch bei der Southern Blot-Analyse von Klongemischen führen derartige Tandemintegrationen zu einer dominanten Bande in der Größe des *Minicircles* und zufällig verteilten, möglicherweise nur schwach sichtbaren Randfragmenten. Die Untersuchung der Gesamt-DNA im Southern Blot

ist daher neben der FISH-Analyse (siehe 2.1.3) nur eine weitere Methode zur Überprüfung des episomalen Status eines Vektors und vor allem bei der Analyse von Klonen sinnvoll.

Abbildung 2.3 B zeigt die Southern Blot-Analyse mehrerer Klongemische nach einer Kultivierungsdauer der CHO-K1-Zellen, die etwa 26 Generationen entspricht. Die Hybridisierung mit einer Sonde aus dem Bereich des eGFP-Gens nach einem Verdau der Gesamt-DNA mit *Bam*HI zeigt für drei verschiedene *Minicircle*-Klongemische eine Bande bei 4,1 kb, was der Größe des linearisierten *Minicircle*-Vektors entspricht. Für pEpi-FGSARF ist ohne G418-Selektion keine *egfp*-spezifische Bande detektierbar. Der Verlust der Transgenexpression (Abbildung 2.2) geht folglich mit dem Verlust des Vektors einher, es findet also eine „Ausverdünnung“ des Vektors durch Zellteilung statt, und das Plasmid ist ohne Selektionsdruck in CHO-K1-Zellen nicht etablierbar. Das G418-selektionierte Klongemisch zeigt sowohl eine Bande in der Größe des linearisierten Plasmids pEpi-FGSARF als auch deutliche zusätzliche Banden in unterschiedlichen Größen, die unerwünschte, zufällige Integrationen in das zelluläre Genom belegen.

Eine Southern Blot-Analyse der Gesamt-DNA aus eGFP-exprimierenden NIH3T3-Klongemischen, die ein- bzw. zweimal mittels FACS angereichert wurden (Daten nicht gezeigt), weist bei Hybridisierung mit einer DNA-Sonde aus der SV40-Replikationsursprung/Promotor-Sequenz ebenfalls eine dominante Bande in Größe des linearisierten *Minicircles* auf (Abb. 2.3 C).

Eine Southern Blot-Analyse der Gesamt-DNA von Klongemischen ermöglicht keinen endgültigen Nachweis des episomalen Status, allerdings lassen sich so erste Aussagen über das Ausmaß der zufälligen Integrationen in das zelluläre Genom treffen. In den hier untersuchten CHO-K1-Zellen führte die Etablierung des Vektors pEpi-FGSARF mit G418-Selektionsdruck zu deutlichen zusätzlichen Banden und zeigt so einen hohen Anteil von Zellen mit integrierten Vektorsequenzen im Gemisch, die über den Selektionsdruck angereichert wurden.

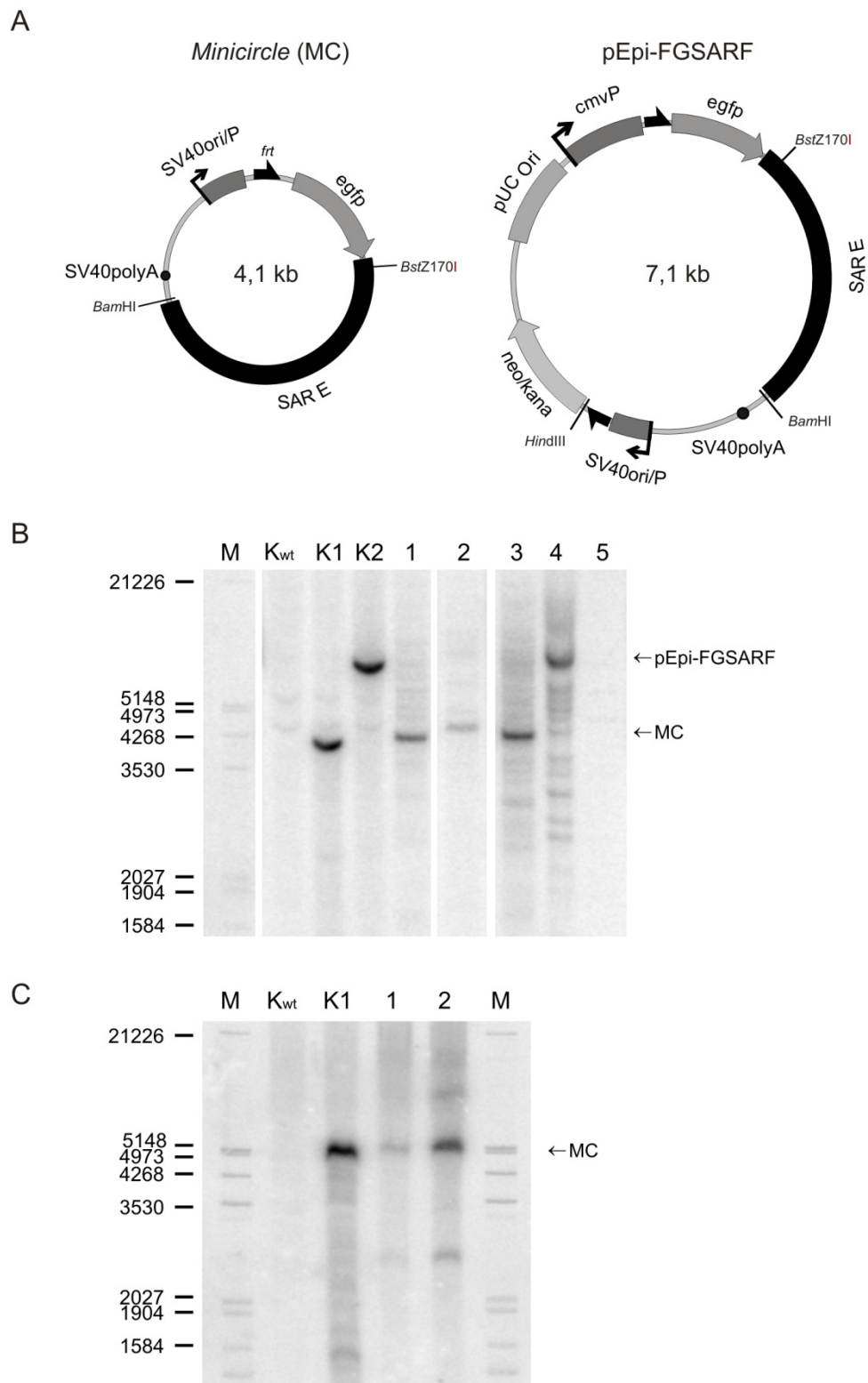


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Vektoren und Southern Blot-Analysen

A: Schematische Darstellung des *Minicircle*-Vektors und des pEpi-Vektors. Die für die Southern Blot-Analysen eingesetzten Schnittstellen sind eingezeichnet.

B: Southern Blot-Analyse der nach 26 Generationen isolierten Gesamt-DNA aus CHO-K1-Zellen. Die DNA wurde mit *Bam*HI verdaut und anschließend mit einer Sonde aus dem Bereich des *egfp*-Gens hybridisiert. 1-3: *Minicircle*-Klongemische; 4: pEpi-Klongemisch, G418 selektiert; 5: pEpi ohne Selektion. Marker: λ *Hind*III/*Eco*RI, S³⁵ markiert.

C: Southern Blot-Analyse der nach 65 Generationen isolierten Gesamt-DNA aus NIH3T3 Zellen, Hybridisierung mit SV40ori/P-Sonde nach *Bam*HI-Verdau. Kwt: Kontrolle, DNA aus nichttransfizierten CHO-K1; K1: Kontrolle, DNA aus nichttransfizierten CHO-K1 + 100 pg linearisierte *Minicircle*-DNA. Die Höhe der Banden für die *Minicircle*-Kontrolle K1 und die Klongemische bei 5,1 kb statt 4,1 kb resultiert aus der hohen Konzentration der hier eingesetzten chromosomalen DNA und dadurch verändertem Laufverhalten bei der Gelelektrophorese im Vergleich zum verwendeten Marker.

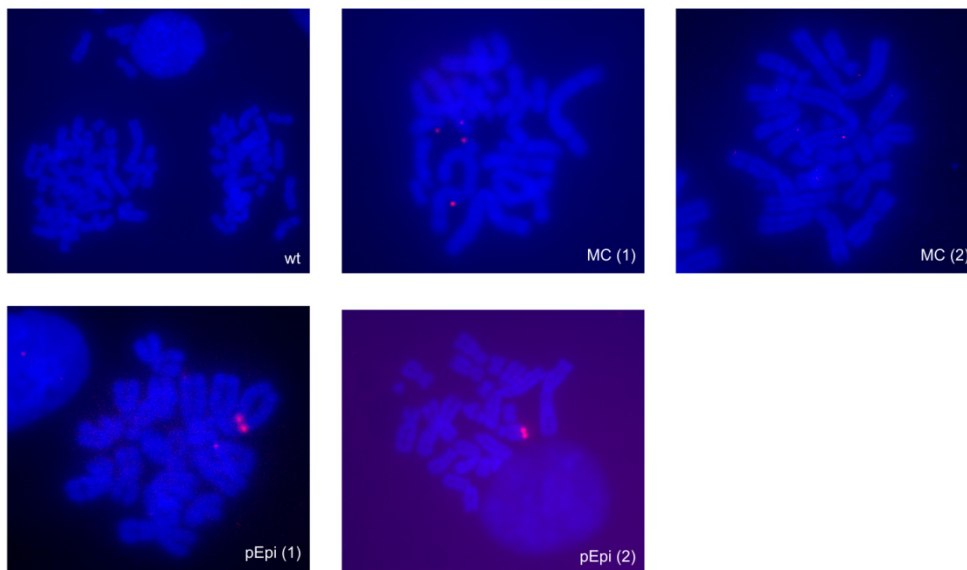
2.1.3 Nachweis des episomalen Status mit FISH

Als Nachweis des episomalen Status des *Minicircle*-Vektors wurde in Zusammenarbeit mit Kristina Nehlsen, HZI, die Methode der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) herangezogen (Nehlsen et al., 2006; Baiker et al., 2000). CHO-K1- und HEK293-Zellen wurden hierfür durch Zugabe des Spindelgifts Colcemid in ihrer mitotischen Phase angereichert. Auf Objektträgern wurden sogenannte *spreads* der Metaphase-Chromosomen hergestellt, und diese anschließend mit einer Fluoreszenz-markierten DNA-Sonde aus dem Parentalplasmid hybridisiert. Episomal vorliegende *Minicircle*- bzw. pEpi-Moleküle zeigen sich als punktförmige, fluoreszierende Signale. Wie von Baiker et al. (2000) auch für den Vektor pEpi gezeigt, liegen diese Fluoreszenzsignale zufällig verteilt und mit den Metaphase-Chromosomen assoziiert vor (Abbildung 2.4). Die mechanische Belastung bei Herstellung der Metaphase-*spreads*, etwa durch Scherkräfte, führt meist zur Umverteilung der nur lose assoziierten Vektormoleküle (Stehle et al., 2007). Bei fester Assoziation wäre eine symmetrische Anordnung zweier Signale an beiden Chromosomenarmen zu erwarten, wie es beispielsweise für den episomalen EBV-Virus gezeigt wurde (Kanda et al., 2007). Die zufällige Verteilung der Vektormoleküle durch das FISH-Verfahren macht aber auch deutlich, dass keine integrierte, sondern extrachromosomal vorliegende Vektor-DNA mit der Fluoreszenzsonde detektiert wurde.

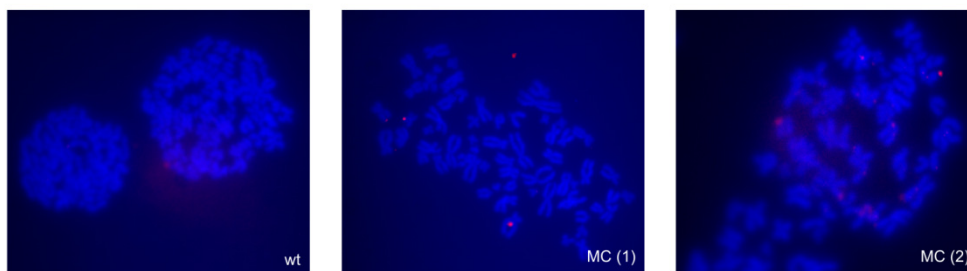
Eine Integration von typischerweise mehreren Vektorkopien *in tandem* in das zelluläre Genom kann hingegen durch intensive Signale auf beiden Chromosomen-Armen, die sog. *doublets*, detektiert werden. Solche *doublets* konnten für etwa 40% der untersuchten Metaphase-*spreads* des G418-selektierten pEpi-Klongemisches festgestellt werden, nicht aber für die *Minicircle*-Klongemische (Abbildung 2.4).

Eine Auszählung der spezifischen Signale ergab für den *Minicircle* in CHO-K1-Zellen 6,7 (+/- 3,5) episomale Kopien bzw. 2,6 (+/- 0,9) Kopien in HEK293-Zellen.

CHO-K1



HEK293

**Abb. 2.4: Analysen mittels Metaphase-FISH**

Die FISH-Analysen wurden 55 Generationen nach der Transfektion durchgeführt. Für die mit *Minicircle*-DNA transfizierten Zellen (MC) können punktförmige, fluoreszierende Signale der episomalen DNA detektiert werden. Die Kontrollen (wt) für CHO-K1 und HEK293 zeigen keine derartigen Signale. Integration des Vektors zeigt sich mit intensiven, doppelten Signalen auf beiden Chromosomenarmen. Etwa 40% der mit pEpi-FGSARF transfizierten Zellen zeigen sog. *doublets*, wie sie hier abgebildet sind.

Es konnte hiermit gezeigt werden, dass der *Minicircle*-Vektor in den schnellteilenden Zelllinien CHO-K1, NIH3T3 und HEK293 in einem Teil der transfizierten Zellen etabliert und stabil episomal repliziert wird. Die Etablierung eines S/MAR-basierten *Minicircles*, ohne Selektionsmarker und folglich ohne Selektionsdruck, ist demnach in diesen Zelllinien möglich.

2.2 Untersuchungen an CHO-K1-Klonen

Bisherige Untersuchungen hatten sich auf mittels FACS angereicherte Klongemische der Zelllinien CHO-K1, HEK293 und NIH3T3 beschränkt (Nehlsen et al., 2006). Hier sollte erstmals eine Analyse von Klonen vorgenommen werden, um verlässliche Aussagen über den episomalen Zustand des replizierenden *Minicircle*-Vektors in einer Zelle, den Anteil von Zellklonen mit sogenannter zufälliger Integration in das Genom („*random integration*“) und eventuell auch Kopienzahlen in Klonen mit unterschiedlicher Expressionshöhe treffen zu können. Es wurden CHO-K1-Zellen verwendet, da diese Zelllinie in der biotechnologischen Industrie zur Herstellung von Proteinen eine herausragende Rolle spielt. Die vorliegenden Untersuchungen bilden daher die Grundlage eines durch die Industrie geförderten Projekts zur Herstellung von Antikörpern mit episomal replizierenden *Minicircle*-Vektoren.

2.2.1 Generierung und Charakterisierung der CHO-K1-Klone

Mittels Lipofektion wurden CHO-K1-Zellen mit *Minicircle*-DNA (siehe Abbildung 2.3) transfiziert und sowohl eGFP-exprimierende Klone als auch Klongemische am FACS sortiert. Die Zellklone wurden mit Southern Blot charakterisiert und das eGFP-Expressionslevel per FACS-Messung analysiert.

Die Southern Blot-Analyse der extrahierten Gesamt-DNA mit einer *egfp*-DNA-Sonde zeigte, dass in einem überwiegenden Anteil der Klone neben der Bande, die einem episomal vorliegenden, linearisierten *Minicircle* entspräche, mindestens eine weitere zusätzliche Bande detektiert werden kann. Bei der Gesamt-DNA von drei der insgesamt 69 untersuchten Einzelklone kann ausschließlich episomal vorliegende *Minicircle*-DNA, die linearisiert 4,1 kb entspricht, nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist unerwartet und überraschend, da bisher in der Analyse von sortierten CHO-K1-Klongemischen mittels FISH die Zellen mit episomal vorliegender *Minicircle*-DNA vorherrschend waren (siehe 2.1.3 und Nehlsen et al., 2006). Möglicherweise übt die Vereinzelung der CHO-K1-Zellen bei der Sortierung mittels FACS und der damit verbundene Stress einen negativen Einfluss auf den episomalen Status des Vektors aus. Eine andere Möglichkeit sind Mängel in der Gelaufreinigung der *Minicircle*-DNA, worauf auch die Hybridisierung des Southern Blots mit einer DNA-Sonde aus dem Bereich des Gens für die Neomycin-Phosphotransferase (*neo/kana*) hindeutet. Diese Analyse zeigte zusätzliche Integrationen von Sequenzen, die entweder aus dem Rückgrat des Parentalplasmides oder aus dem Miniplasmid stammen können (Abbildung 2.5 C), also eindeutig aus Kontaminationen der transfizierten *Minicircle*-DNA resultieren.

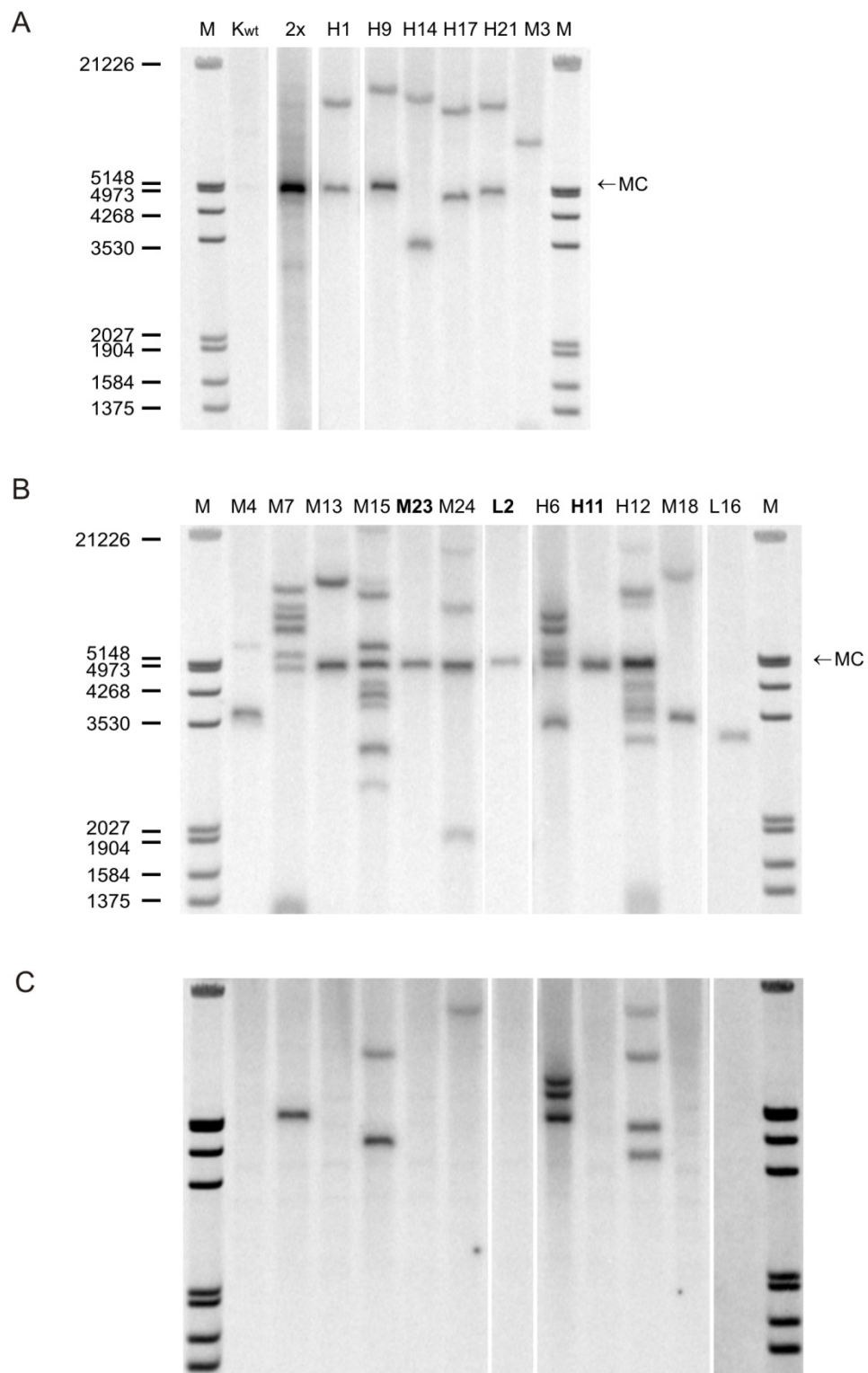


Abb. 2.5: Southern Blot-Analysen der CHO-K1-Klone

A, B: Southern Blot-Analyse der isolierten Gesamt-DNA aus CHO-K1-Klonen. Die DNA wurde mit *Bst*Z17I (sog. *single cutter* des *Minicircles*, siehe Abb. 2.3 A) verdaut und anschließend mit einer Sonde aus dem Bereich des *egfp*-Gens hybridisiert. Die drei Klone, die nur eine Bande von 4,1 kb aufweisen, sind gekennzeichnet. Kwt: Kontrolle, DNA aus nichttransfizierten CHO-K1. 2x: sortiertes *Minicircle*-Klongemisch. Marker: λ *Hind*III/*Eco*RI, S³⁵ markiert.

C: Der in B gezeigte Southern Blot wurde außerdem mit einer Sonde aus dem Bereich des *neo/kana*-Gens hybridisiert. Es zeigen sich zufällige Integrationen des Resistenzmarkergens, die entweder aus Verunreinigung der DNA mit dem Parentalplasmid oder dem Miniplasmid stammen können.

Um mögliche Kontaminationen der transfizierten DNA mit Miniplasmid- oder Parentalplasmid-DNA zu detektieren, bevor diese in das Genom integriert, wurde nur wenige Tage nach einer Transfektion von *Minicircle*-DNA in CHO-K1-Zellen die Gesamt-DNA der Zellen isoliert. Die Hybridisierung des Southern Blots mit einer Sonde aus dem Bereich des *neo/kana*-Gens zeigt, dass linearisiertes Miniplasmid transfiziert wurde (Abbildung 2.6). Es handelt sich hierbei um eine Verunreinigung, die aus der Gelaufreinigung der *Minicircle*-DNA stammt. Da diese Miniplasmid-DNA in eukaryotischen Zellen nicht repliziert wird, verdünnt sie sich im Verlauf der Kultivierung, sofern sie nicht zufällig integriert, was bei 8 von 27 untersuchten Einzelklonen auftrat.

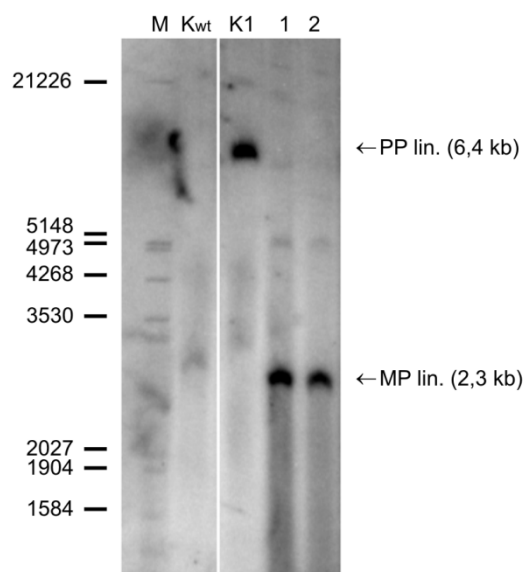


Abb. 2.6: Southern Blot-Analyse der nach der Transfektion isolierten Gesamt-DNA

Die Gesamt-DNA von CHO-K1-Zellen wurde zwei Tage nach der Transfektion mit *Minicircle*-DNA isoliert, mit *Bst*Z17I verdaut und zur Detektion von Kontaminationen durch Parentalplasmid- und Miniplasmid-DNA mit einer Sonde aus dem Bereich des *neo/kana*-Gens hybridisiert. In den *Minicircle*-Transfektionen 1 und 2 lässt sich so linearisierte Miniplasmid-DNA (MP; 2,3 kb) nachweisen. Kwt: Kontrolle, DNA aus nichttransfizierten wt CHO-K1. K1: Kontrolle, genomische wt CHO-K1-DNA + 100 pg linearisiertes Parentalplasmid pEpi-delCFGsARF; Marker: λ *Hind*III/*Eco*RI, S³⁵ markiert.

Die integrierten Vektorteile in den Southern Blot-Analysen der CHO-K1-Klone (Abbildungen 2.5) belegen, dass es auch mit Lipofektion als Transfektionsmethode

und ohne Selektionsdruck zur zufälligen Integration von Vektorteilen in das Genom von CHO-Zellen kommen kann. Möglicherweise begünstigen Strangbrüche im *Minicircle* sowie Kontaminationen mit linearem Parental- und Miniplasmid (Abbildung 2.6), entstanden durch die Gelaufreinigung der DNA, diesen Vorgang. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit standardisierter und reiner Präparationen von *supercoiled Minicircle*-DNA.

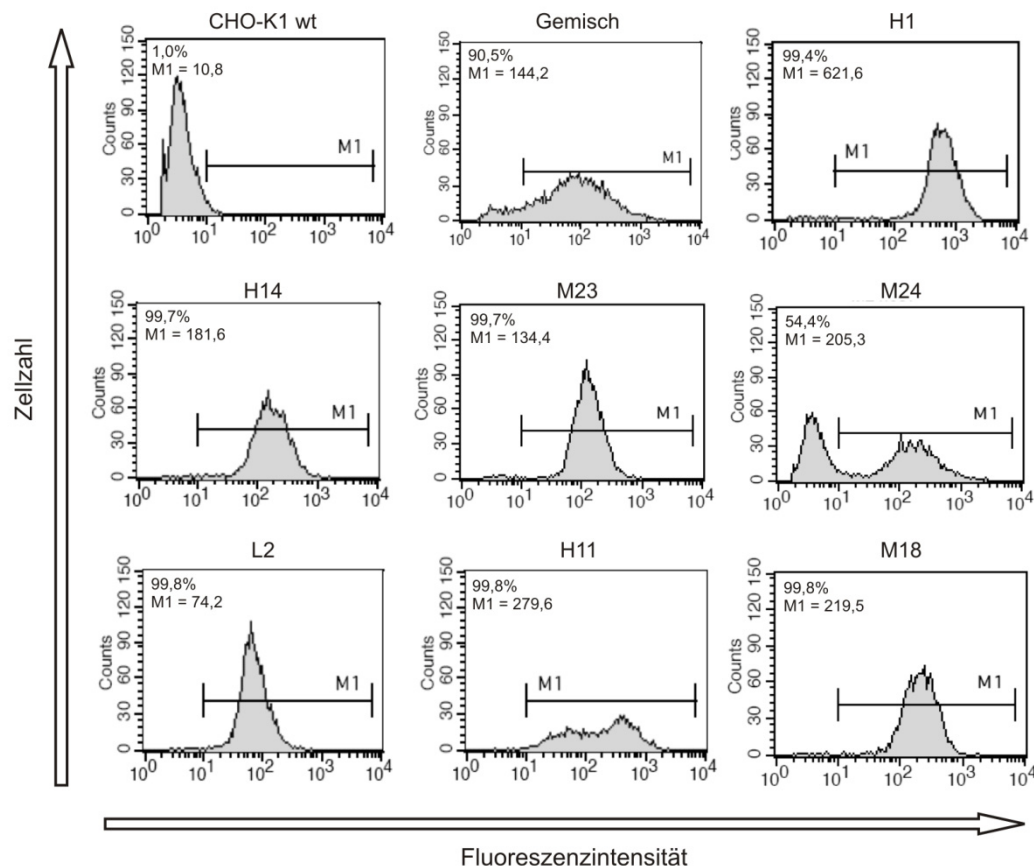


Abb. 2.7: FACS-Analysen einzelner CHO-K1-Klone und eines Klongemischs

Dargestellt sind FACS-Histogramm-Plots zur Bestimmung des prozentualen Anteils eGFP-exprimierender Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensität M1 (*mean*). Die Zellzahl ist über der Fluoreszenzintensität aufgetragen. Der Anteil eGFP-exprimierender Zellen und die Höhe der Fluoreszenzintensität aller exprimierenden Zellen sind angegeben.

Die Zellen der bisher untersuchten *Minicircle*-Klongemische wiesen eGFP-Expressionslevel auf, die um mehr als zwei Größenordnungen variierten (Abbildung 2.7). Diese Expressionsunterschiede sind nicht durch unterschiedliche Kopienzahlen (in CHO-K1 4-10 *Minicircle*-Kopien pro Zelle, siehe 2.1.3) zu erklären, sondern deuten vielmehr auf ein klonales Verhalten der transfizierten Zellen hin. Es wurden daher Klone mit unterschiedlicher eGFP-Expressionshöhe sortiert (Low, Medium, High). Hinweise auf Integrationen fanden sich sowohl bei Hoch- als auch Niedrigexprimierern (Abbildungen 2.5 und 2.7). Durch Sortierung per FACS kann nicht zwischen Klonen mit episomaler und mit integrierter *Minicircle*-DNA unter-

schieden werden, Klone mit integrierter *egfp*-Expressionskassette werden ebenfalls angereichert.

Unter Einbeziehung aller Southern Blot-, PCR- und FACS-Analysen stehen für weitere Untersuchungen die Klone M23 und L2 zur Verfügung. Beide Klone behalten über den gesamten Kultivierungszeitraum von etwa vier Monaten ihr Expressionsniveau bei, was auf feste Assoziations-*sites* der *Minicircle*-Moleküle in der Kernarchitektur hinweist.

2.2.2 Stabilität des episomalen Zustandes und der Transgenexpression des *Minicircle*-Vektors nach Kryokonservierung der CHO-K1-Klone

Das episomal replizierende Plasmid pEpi, welches mit Selektionsdruck in Säugerzellen etabliert werden kann, tendiert beim Einfrieren und späterem Auftauen von Zellklonen zur zufälligen Integration in das Genom (Nehlsen, 2004). Dieses Phänomen, das sich mit steigender Plasmidgröße häuft, behindert die Nutzung von episomal replizierenden Plasmiden zur biotechnologischen Anwendung, wie beispielsweise zur Antikörperherstellung. Daher sollte überprüft werden, ob der *Minicircle*-Vektor in der biotechnologisch relevanten Zelllinie CHO-K1 auch im Klon stabil episomal erhalten bleibt, wenn die Zellen einer Kryokonservierung mit anschließendem Auftauen unterzogen wird. Ebenso wurde der Einfluss auf die Expressionshöhe und den Anteil exprimierender Zellen untersucht.

Vor dem Einfrieren wurden die Klone per Southern Blot und FACS charakterisiert (s. Abbildung 2.5 und 2.8). Danach wurden die Zellen nach einem Standardprotokoll eingefroren, wobei als Einfriermedium fötales Kälberserum mit DMSO-Zusatz zur Vermeidung von Kristallwasserbildung verwendet wurde. Nach einer Lagerung in flüssigem Stickstoff für acht Wochen wurden die Zellsuspensionen aufgetaut und weiter kultiviert. Die erneute Southern Blot-Analyse zeigte für die Klone M23 und L2 keine zufällige Integration des *Minicircles* in das Genom, sondern lediglich eine Bande von 4,1 kb, die dem episomal vorliegenden, linearisierten Vektor entspricht. Auch die FACS-Analysen zeigten keine Veränderung in Bezug auf den Anteil exprimierender Zellen und nur eine geringfügige Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität (Abbildung 2.8). CHO-K1-Klone können also kryokonserviert werden, ohne dass der *Minicircle*-Vektor seinen episomalen Status oder die Transgenexpression einbüßt.

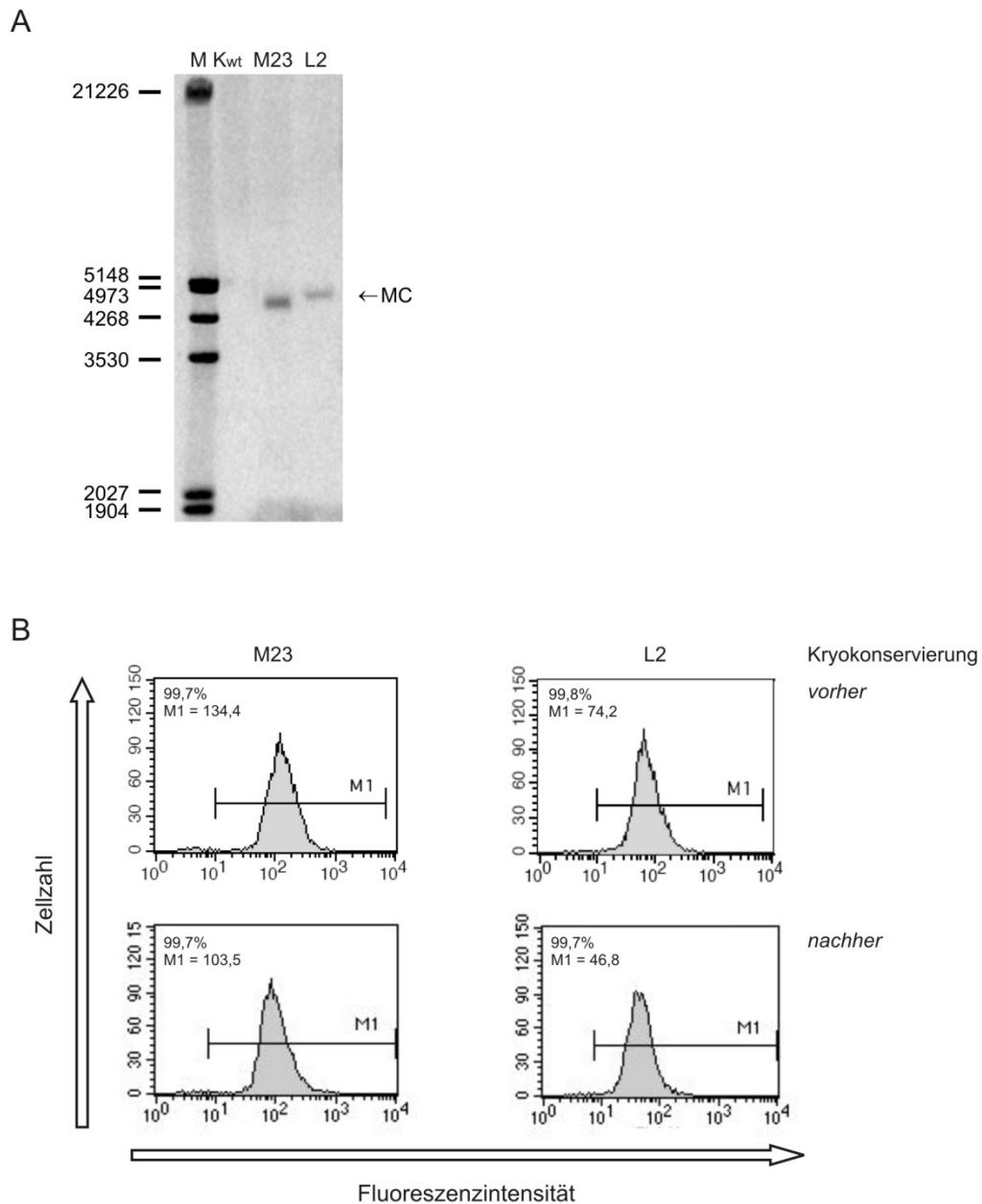


Abb. 2.8: Einfluss der Kryokonservierung auf den episomalen Zustand und die Transgenexpression

A: Southern Blot-Analyse der isolierten Gesamt-DNA der CHO-K1-Klone M23 und L2 nach Kryokonservierung. Verdau mit *Bst*Z17I und Hybridisierung mit *egfp*-Sonde. Kwt: Kontrolle, DNA aus nichttransfizierten CHO-K1; Marker: λ *Hind*III/*Eco*RI, S^{35} markiert.

B: FACS-Histogramm-Plots vor und nach der Lagerung in flüssigem Stickstoff zur Bestimmung des prozentualen Anteils eGFP-exprimierender Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensität M1 (*mean*).

2.2.3 Untersuchung von Deletionseignissen in der *Minicircle*-DNA

In einigen CHO-K1-Klonen konnte mit einer *egfp*-Sonde im Southern Blot eine etwa 3 kb große Bande nachgewiesen werden (Abbildung 2.5). Um festzustellen, ob es sich um eine gehäuft auftretende Deletion handelt, wurden zunächst mehrere Klone mittels PCR genauer charakterisiert (Abbildung 2.9).

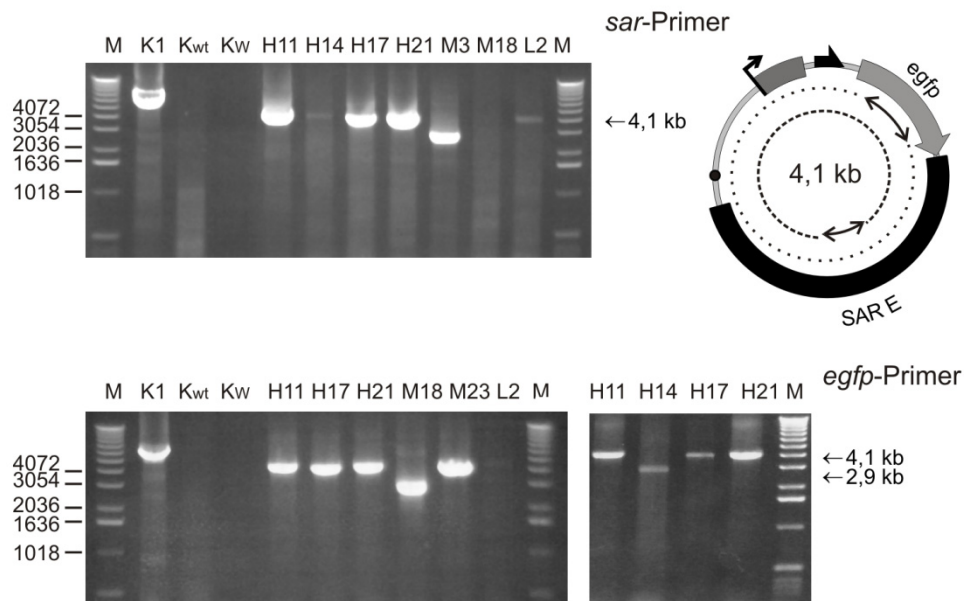


Abb. 2.9: PCR-Analysen einzelner Klone

Die Gesamt-DNA der CHO-K1-Klone wurde isoliert und für die Amplifikation des Vektors in der PCR-Analyse verwendet. Durch die Verwendung der Primerpaare *sar**fwd*/*sar**rev* oder *gfp**fwd*/*gfp**rev*1 kann ein größtmöglicher Anteil des *Minicircles* durch eine PCR-Reaktion amplifiziert werden (siehe schematische Darstellung des Vektors). Das erwartete PCR-Produkt bei kompletter Amplifikation des *Minicircles* hat eine Größe von 4,1 kb. K1: Plasmid-Kontrolle pEpi-delCFG SARF (6,4 kb); M: Marker, 1 kb-Leiter, Größenangaben in bp (Gibco).

Es zeigte sich, dass in den Klonen M18 und H14 mit Primern, die im Bereich des eGFP-Gens binden, eine 3 kb-Bande generiert werden kann, während ein Primer-Paar, das eine *full size*-Amplifikation des Vektors ab der SAR E ermöglichen sollte, keine Bande ergab (Abbildung 2.9). Offenbar wurde ein Teil des S/MAR-Elements, vermutlich durch intramolekulare Rekombination, deletiert.

Diese Annahme konnte durch eine Sequenzierung der mit *egfp*-Primern amplifizierten Vektoranteile bestätigt werden. Das verbliebene S/MAR-Element hat eine Länge von 733 Basenpaaren und ist in beiden Klonen bis auf vier Punktmutationen identisch. Die so erhaltenen Sequenzen wurden S/MAR M18 und S/MAR H14 genannt. Die Klone M18 und H14 wiesen in parallelen FACS-Messungen unterschiedlich hohe eGFP-Expressionen auf (Abbildung 2.7), was

darauf hindeutet, dass es sich tatsächlich um zwei verschiedene Zellklone und nicht um Subklone desselben Klons handelt.

2.3 Charakterisierung eines größenreduzierten S/MAR-Elements

Die Sequenzen der größenreduzierten S/MAR-Elemente aus den Klonen M18 und H14 sind nahezu identisch, weshalb im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit nur das S/MAR-Element M18 einer detaillierten Funktionsanalyse unterzogen wurde, zunächst mit Hilfe eines biomathematischen Ansatzes, einem sogenannten SIDD (*stress-induced duplex destabilization*)-Profil (siehe 1.1.3 und 2.3.1.2). Anschließend sollte untersucht werden, ob diese verkürzte S/MAR eine stabile episomale Replikation in eukaryotischen Zellen vermitteln kann, und zwar sowohl in Form eines S/MAR-basierten *Minicircles* als auch eines pEpi-Derivates (zur Etablierung mit Selektionsdruck).

2.3.1 Sequenzanalyse und biomathematische Vorhersage des S/MAR-Charakters eines größenreduzierten S/MAR-Elements

2.3.1.1 Sequenzvergleich von SAR E und S/MAR M18

Das ursprüngliche, im Vektor pEpi und im *Minicircle* verwendete S/MAR-Element ist ein *Bgl*II und *Eco*RI-geschnittenes, 1984 bp langes Fragment der SAR E aus dem humanen Interferon- β -Gencluster (Nehlsen et al., 2006; Piechaczek et al., 1999).

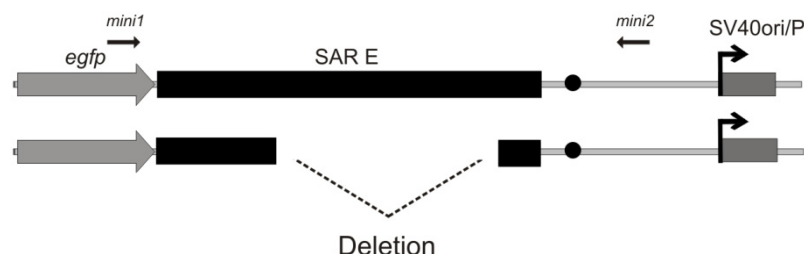


Abb. 2.10: Schematische Darstellung der Deletion im Klon M18

Dargestellt ist ein Vergleich der sequenzierten, verkürzten S/MAR-Sequenz aus dem CHO-K1-Klon M18 mit dem ursprünglichen SAR E des *Minicircle*-Vektors. Die Bindestellen der zur Sequenzierung benutzten Primer *mini1* und *mini2* sind eingezeichnet. Die aufgetretene Deletion betrifft 1251 bp aus dem 3'-Abschnitt des SAR E. Das Sequenz-Alignment von SAR E und H14 entspricht dem hier dargestellten Ergebnis von SAR E und M18.

Ein Sequenzabgleich der größenreduzierten S/MAR M18 mit dem SAR E-Element des Vektors pEpi zeigt, dass die ersten 641 Basenpaare und die letzten 92 Basenpaare übereinstimmen (Abbildung 2.10). In Klon M18 sind also 1251 Basenpaare aus dem 3'-Abschnitt des SAR E deletiert. Das verbliebene *Bgl*II/*Eco*RI-S/MAR-Fragment ist 733 Basenpaare groß.

2.3.1.2 SIDD-Analysen von SAR E und S/MAR M18

Biochemische Analysen zeigten, dass S/MAR-Elemente, wie auch die SAR E, ein hohes Potential zur Einzelstrangbildung besitzen (Mielke et al., 1990; Bode et al., 1992). Zur Vorhersage dieser Eigenschaft dient das sogenannte *Stress-Induced Duplex Destabilization* (SIDD)-Profil, dessen Berechnung auf der durch Torsionsspannung induzierten Basenpaartrennung in S/MAR-Regionen beruht (Benham et al. 1997). Das SIDD-Profil zeigt Bereiche mit besonders hoher Tendenz zur Einzelstrangbildung durch Peaks an, indem die Freie Energie $G(x)$, die benötigt wird, um ein Basenpaar an jeder Position x der DNA-Sequenz zu trennen, über der analysierten Sequenz aufgetragen wird (siehe auch Götze, 2003).

Abbildung 2.11 vergleicht die SIDD-Profile zweier *Minicircle*-Vektoren mit der SAR E und der Größenreduzierten S/MAR M18. Obwohl das SIDD-Profil und die korrespondierenden Vektorabschnitte hier linear dargestellt sind, dienen die zirkulären Moleküle als Berechnungsgrundlage. Es fällt auf, dass sowohl der erste als auch der zweite dominante Peak der SAR-Sequenzen in der S/MAR M18 stärker ausgeprägt ist, also einen kleineren Wert für $G(x)$ aufweist. Im dritten Hauptpeak der SAR E liegt die „Bruchstelle“, an der in den Klonen M18 und H14 eine Deletion auftrat. Der in der Abbildung violett markierte Bereich entspricht der mittels Sequenzvergleich für M18 und H14 gezeigten Deletion. Die Bereiche vor und hinter den Bruchstellen fügen sich zu einem weiteren destabilisierten Peak zusammen.

Der Vergleich der SIDD-Profile zeigt, dass das S/MAR-Element M18 aufgrund verminderter Konkurrenz eine größere Tendenz zur lokalen Strangtrennung besitzt als die SAR E. Zudem hat die Deletion Auswirkungen auf die Destabilisierung anderer Vektorelemente im *Minicircle*. Die SV40-Polyadenylierungsstelle 3' der S/MAR M18 befindet sich nun in einem deutlich destabilisierten Bereich und auch der SV40-Replikationsursprung/Promotor weist einen wesentlich stärker destabilisierten Peak auf (Abbildung 2.11).

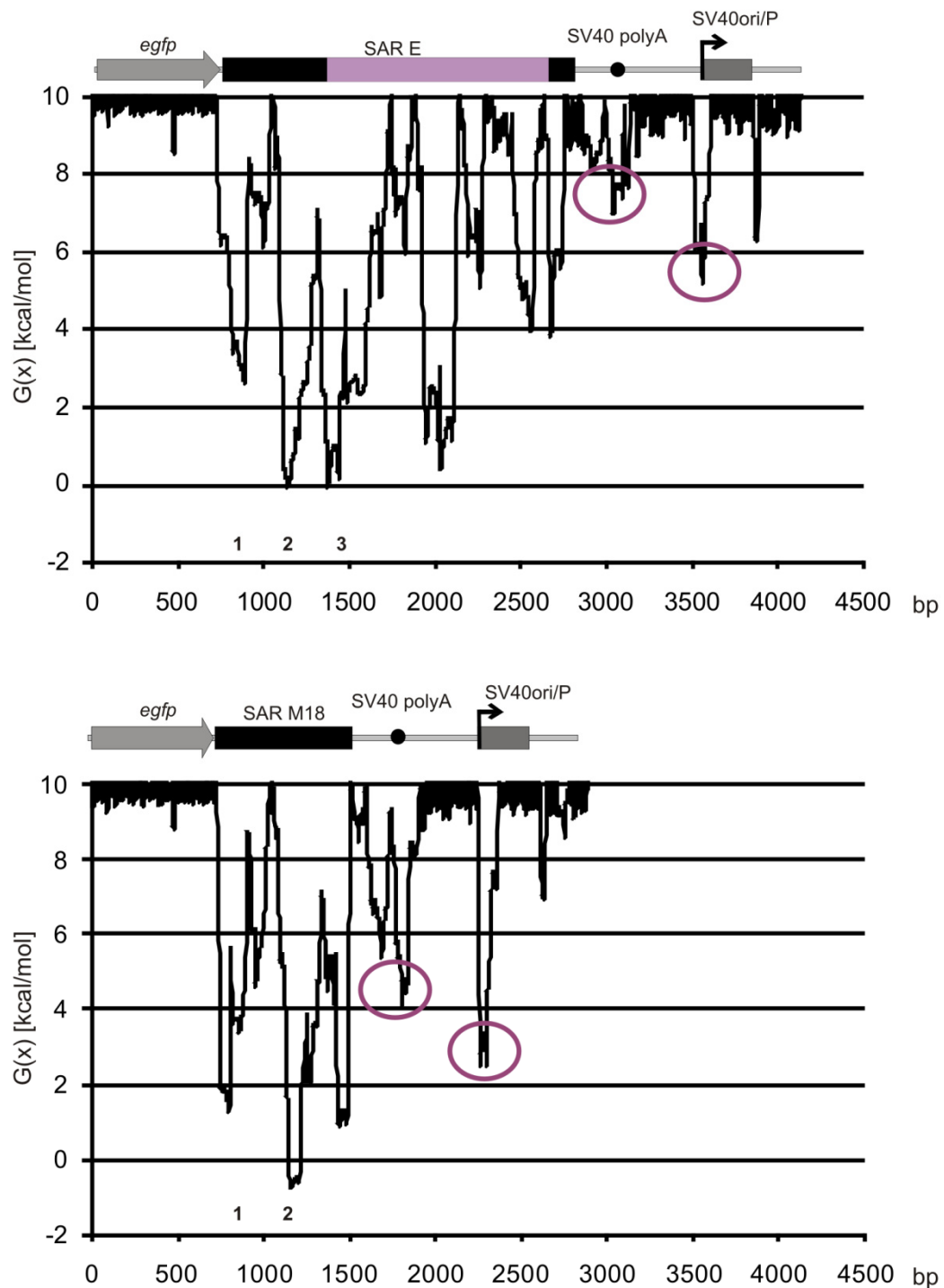


Abb. 2.11: SIDD-Analysen der Minicircle-Sequenzen mit SAR E bzw. S/MAR M18

In den SIDD-Profilen ist die freie Energie über der Sequenz aufgetragen. Je niedriger der Wert für $G(x)$, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, einzelsträngige Bereiche auszubilden. Der deletierte Bereich der SAR E ist violett gekennzeichnet. Die Zahlen (1-3) bezeichnen die Hauptpeaks der SAR-Elemente. Die destabilisierten Peaks der SV40-Polyadenylierungsstelle und des SV40-Promotors sind markiert.

2.3.2 Herstellung eines replizierenden *Minicircles*-Vektors auf der Grundlage des größtenreduzierten S/MAR-Elements M18

Aus dem CHO-K1-Klon M18 wurde die größtenreduzierte S/MAR-Sequenz mittels PCR amplifiziert und in ein Parentalplasmid zur *Minicircle*-Herstellung kloniert. In diesem Parentalplasmid sind das eGFP-Gen, das S/MAR-Element und der SV40-Replikationsursprung von zwei gleichgerichteten Flp-Rekombinase-Erkennungsstellen (FRT-sites) flankiert (Abbildung 2.12 A).

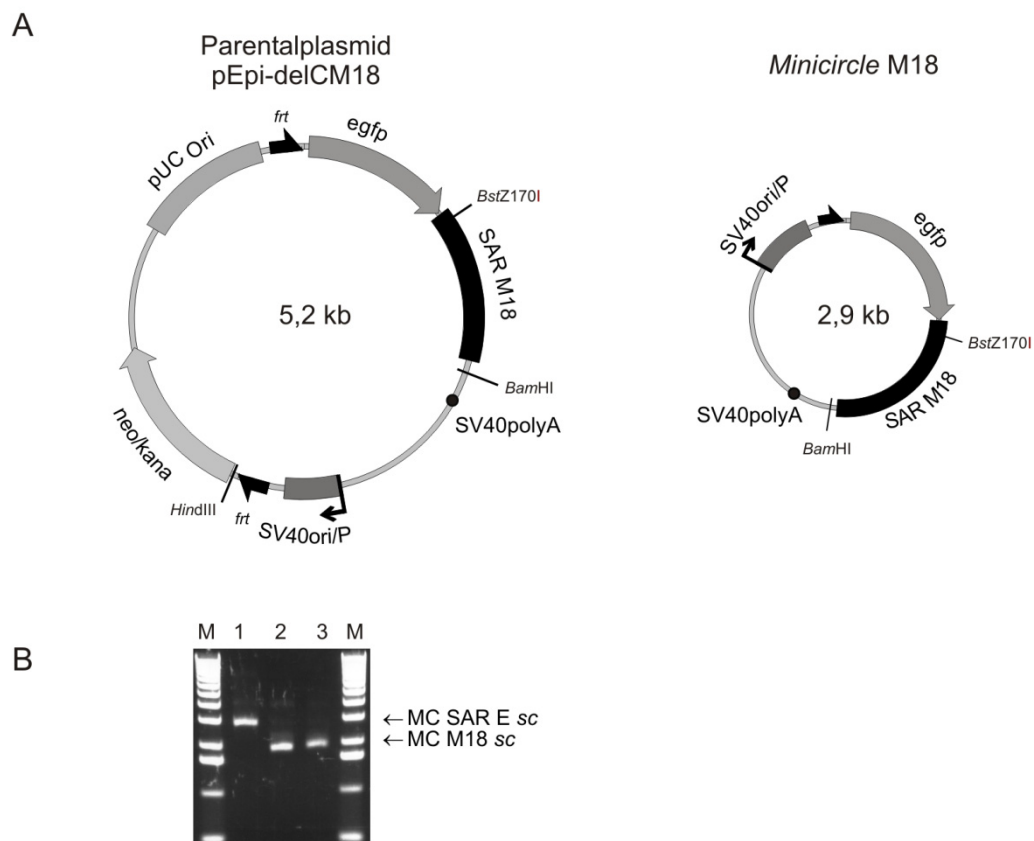


Abb. 2.12: Schematische Darstellung der Vektoren und Gelelektrophorese der *Minicircle*-DNA

A: Schematische Darstellung des Parentalplasmids pEpi-delCM18 zur Herstellung des *Minicircles* M18. Die für die Southern Blot-Analysen verwendeten Schnittstellen sind eingezeichnet.

B: Gelelektrophorese der unverdauten *Minicircle*-DNA nach der Rekombination in Flp-exprimierenden *E. coli* und Aufreinigung durch Gelextraktion. 1: *Minicircle*-DNA SAR E, *supercoiled*; 2 und 3: *Minicircle*-DNA M18, *supercoiled* (2 Chargen); Marker: 1 kb-Leiter (Gibco).

Die Herstellung der *Minicircle*-Vektoren in einem Flp-Rekombinase-exprimierenden *E. coli*-Stamm und die anschließende Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung erfolgte wie beschrieben (siehe 2.1.1 und 4.13 bzw. Nehlsen et al., 2006). Es konnte hierbei eine Rekombinationseffizienz von 40% bis 60% erreicht werden, was den Werten für den *Minicircle* mit SAR E-Element entspricht. Abbildung 2.12 B zeigt die

Gelelektrophorese der aufgereinigten *supercoiled Minicircle*-DNA mit SAR E- bzw. S/MAR M18-Element.

2.3.3 Vergleich von M18- und SAR E-basierten *Minicircle*-Vektoren

Da die Deletionseignisse in der S/MAR in CHO-K1-Zellen stattfanden und auch ein Großteil der Daten zum SAR E-basierten Vektor-Prototyp pEpi-1 und dem replizierenden *Minicircle*-Vektor aus dieser Zelllinie stammen (Piechaczek et al., 1999; Baiker et al., 2000; Nehlsen et al., 2006), wurde die Effektivität der größenreduzierten S/MAR zur Vermittlung der episomalen Replikation zunächst in dieser Zelllinie überprüft. Dieser Vergleich wurde in zwei separaten Experimenten zu verschiedenen Zeitpunkten mit unterschiedlichen *Minicircle*-DNA-Chargen durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich bei den Messwerten in den nachfolgenden Abbildungen um Mittelwerte der zwei Versuchsreihen.

2.3.3.1 Anreicherung stabil exprimierender Zellen

Äquivalente Mengen der *Minicircle*-DNA mit SAR E-Element (im folgenden *Minicircle* SAR E) und der größenreduzierten S/MAR M18 (im folgenden *Minicircle* M18) wurden mittels Lipofektion in CHO-K1-Zellen eingebracht. Fünf bis sieben Tage nach der Transfektion, einem Zeitraum, der bei CHO-K1-Zellen etwa fünf bis sieben Zellverdopplungen (Generationen) entspricht, wurden die eGFP-exprimierenden Zellen durch eine Sortierung mittels FACS angereichert. In diesen sortierten Zellpopulationen sank der Anteil eGFP-exprimierender Zellen sowohl für *Minicircle* SAR E als auch *Minicircle* M18. Eine zweite Sortierung folgte daher weitere 14 Tage später (Daten nicht gezeigt).

2.3.3.2 Expressionsverhalten der *Minicircle*-Vektoren SAR E und M18 in CHO-K1-Zellen

Das Expressionsverhalten der mit zwei Sortierungen angereicherten *egfp*-exprimierenden Subpopulationen wurde durch regelmäßige FACS-Analysen über einen Zeitraum von fünf Monaten bestimmt.

Der Anteil exprimierender Zellen im Klongemisch *Minicircle* SAR E sank dabei kontinuierlich von über 90% auf 77%. Im Klongemisch *Minicircle* M18 fiel der Anteil eGFP-exprimierender Zellen in den ersten sieben Wochen nach der zweiten Sortierung von über 90% auf etwa 85%, um dann konstant zu bleiben (Abbildung 2.13 A). Die relative Fluoreszenzintensität als Ausdruck der eGFP-Expressionshöhe lag für die M18-Klongemische im Mittel doppelt so hoch wie für die SAR E-Klongemische. Zudem sank dieser Wert für den *Minicircle* SAR E im weiteren Verlauf der fünfmonatigen Kultivierung, blieb aber für den *Minicircle* M18 nahezu konstant (Abbildung 2.13 B).

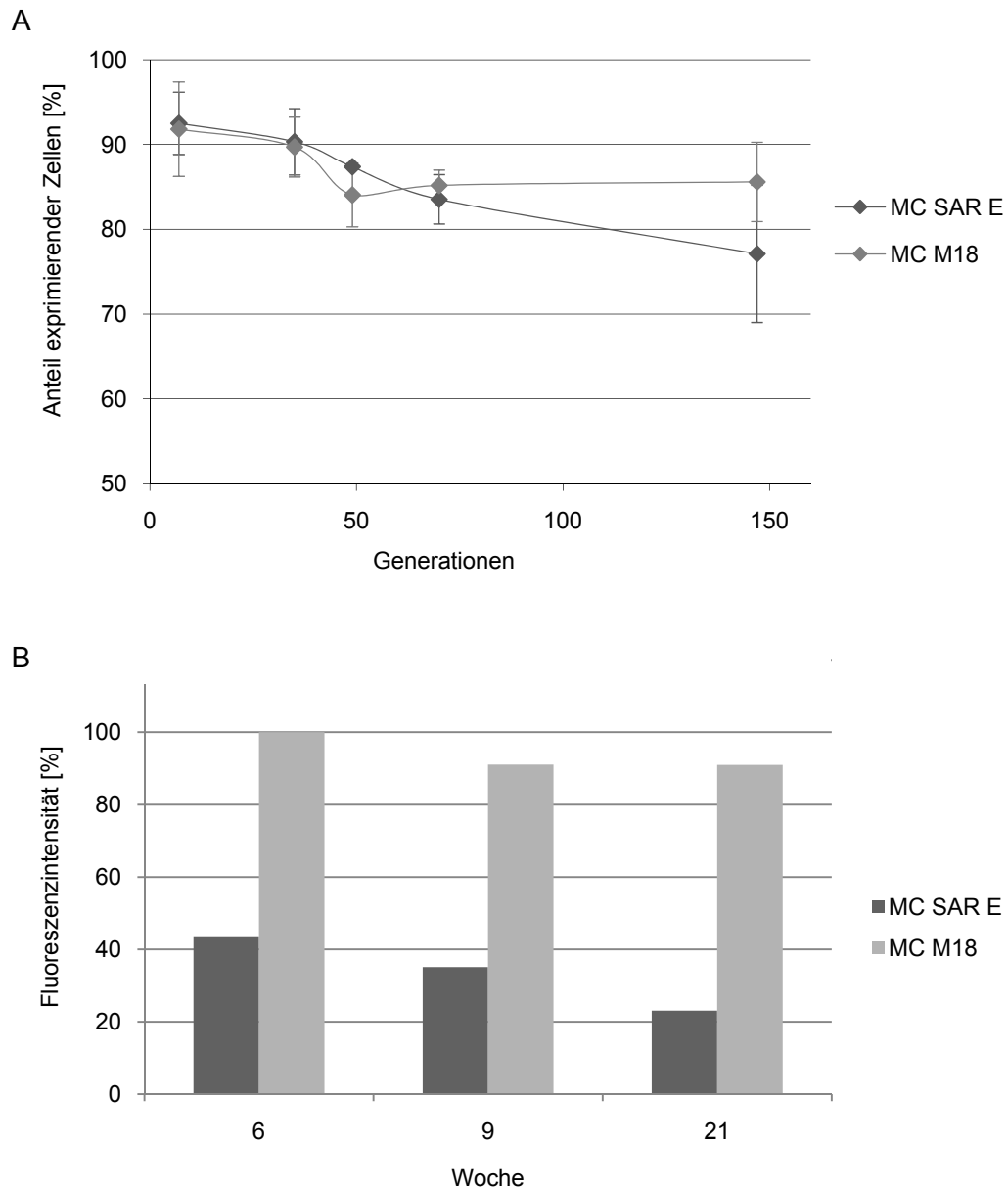


Abb. 2.13: Langzeitexpressionsdaten der *Minicircle*-Vektoren SAR E und M18

A: Durch zwei Sortierungen am FACS angereicherte eGFP-exprimierende Klongemische wurden in regelmäßigen Abständen über 21 Wochen durch FACS-Messungen analysiert. Dargestellt ist hier der prozentuale Anteil eGFP-exprimierender Zellen über der Zeit (0 = Tag der 2. Sortierung, Generationen = Zellverdoppelungen).

B: Entwicklung der Fluoreszenzintensität der sortierten Klongemische. Die Fluoreszenzintensität der M18-Klongemische bei der ersten Messung wurde gleich 100% gesetzt. Es handelt sich um Mittelwerte aus zwei Versuchsreihen.

2.3.3.3 Episomale Stabilität und Integrationshäufigkeit der *Minicircle*-Vektoren SAR E und M18

Parallel zu den FACS-Messungen erfolgte die Isolierung der Gesamt-DNA der Klongemische und Southern Blot-Analysen. Zufällige Integrationen des *Minicircle*-Vektors in das zelluläre Genom können durch Hybridisierung mit einer Sonde aus dem Bereich der Expressionskassette nachgewiesen werden.

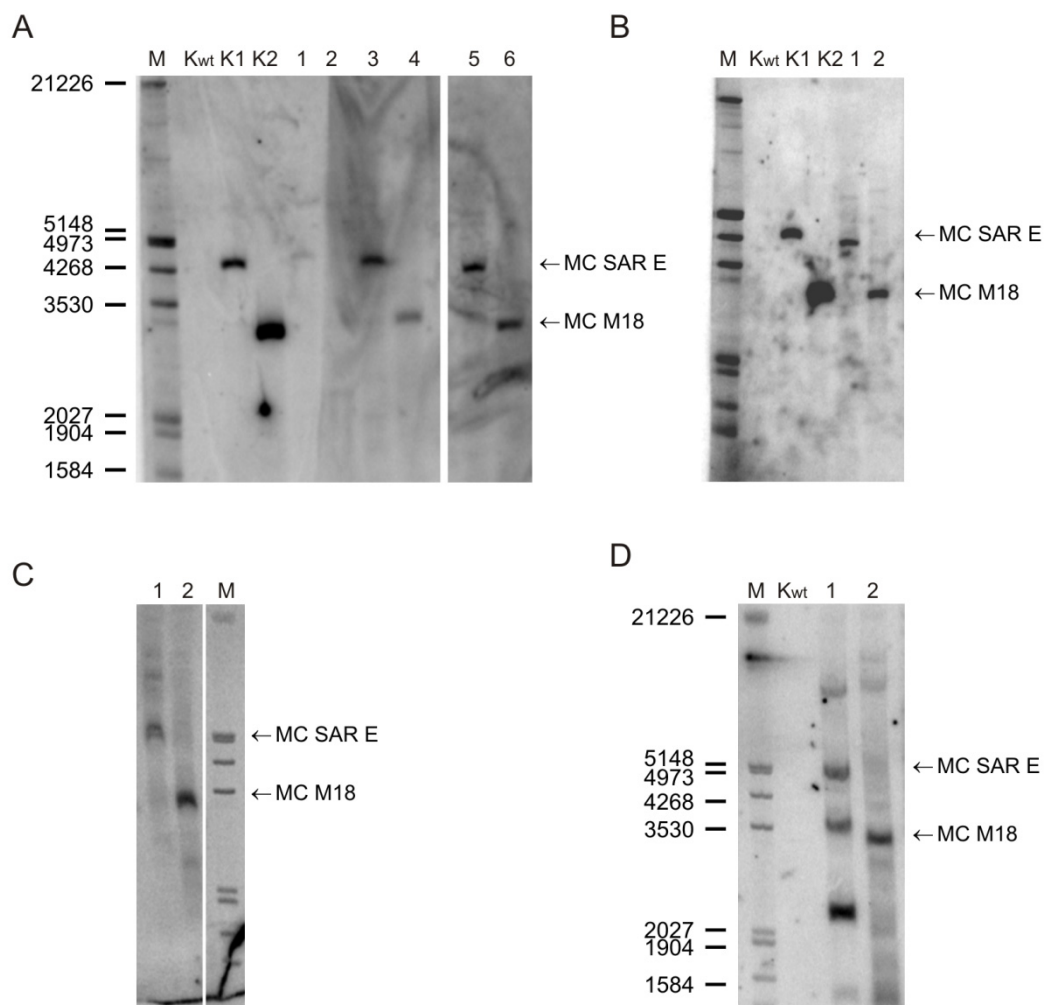


Abb. 2.14: Stabilität und episomaler Status der *Minicircle*-Vektoren SAR E und M18

A: Southern Blot Woche 1 mit *egfp*-Sonde. Kontrollen u. 1-4: *Bst*Z17I-Verdau. 5 + 6: *Bam*HI-Verdau. Kwt: Kontrolle, DNA aus nichttransfizierten CHO-K1; K1: K1: Kontrolle + 100 pg linearisierte *Minicircle*-DNA SAR E 4,1 kb; K2: Kontrolle + 100 pg linearisierte *Minicircle*-DNA M18 2,9 kb. 1: *Minicircle* SAR E 1x sortiert; 2: *Minicircle* M18 1x sortiert; 3: *Minicircle* SAR E 2x sortiert; 4: *Minicircle* M18 2x sortiert; 5: *Minicircle* SAR E 2x sortiert; 6: *Minicircle* M18 2x sortiert; Marker: λ *Hind*III/*Eco*RI, S³⁵ markiert.

B: Southern Blot Woche 3 mit SV40-Sonde nach *Bst*Z17I-Verdau. 1: *Minicircle* SAR E 2x sortiert; 2: *Minicircle* M18 1x sortiert;

C: Southern Blot Woche 5 mit *egfp*-Sonde nach *Bam*HI-Verdau (s.o.).

D: Southern Blot Woche 21 mit *egfp*-Sonde nach *Bst*Z17I-Verdau (s.o.).

Abbildung 2.14 A zeigt eine Southern Blot-Analyse zum Beginn des Kultivierungszeitraums. Sowohl der Verdau der Gesamt-DNA mit *Bst*Z17I als auch mit *Bam*HI ergibt nach der Hybridisierung mit einer gegen das eGFP-Gen gerichteten Sonde eine spezifische Bande bei 4,1 kb für das Klongemisch des *Minicircle*-Vektors mit SAR E bzw. 2,9 kb für den *Minicircle* M18 (Darstellung der Vektoren mit Restriktionsschnittstellen siehe Abbildung 2.12 A). Ein weiterer Southern Blot in der dritten Woche der Kultivierung wurde nach einem *Bst*Z17I-Verdau mit einer Sonde aus dem Bereich des SV40-Promoters hybridisiert (2.14 B). Es konnten in den ersten drei Wochen der Kultivierung der Klongemische keine unspezifischen Banden detektiert werden. Es zeigte sich, dass im weiteren Verlauf der Kultivierung die Anzahl der Banden, die im Southern Blot auf eine zufällige Integration hinweisen für das Klongemisch *Minicircle* SAR E stieg (siehe Abbildung 2.14 C und D). Für das Klongemisch *Minicircle* M18 dagegen waren deutlich weniger zusätzliche Banden detektierbar. Dies belegt eine höhere Stabilität des episomalen Status des *Minicircle*-Vektors M18. Die gezeigten Southern Blots sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuchsreihen.

Ein auf dem verkürzten S/MAR-Element M18 basierender *Minicircle* kann folglich in CHO-K1-Zellen etabliert werden und wird stabil repliziert. Gegenüber dem *Minicircle* SAR E zeigt der *Minicircle* M18 eine stabilere und höhere Transgenexpression (Abbildung 2.13) und überlegene episomale Stabilität (Abbildung 2.14) bei verbesserter Klonierungskapazität durch die geringere Größe der zur episomalen Replikation notwendigen S/MAR-Sequenz. Zusätzlich sollte das größenreduzierte S/MAR M18 nun auch in ein Plasmid vom pEpi-Typ kloniert werden, um die Stabilität und Vermittlung von Episomalität unter Selektionsdruck zu erproben.

2.3.4 Vergleich von M18- und SAR E-basierten pEpi-Vektoren

Das SAR E-Element des Plasmids pEpi-FGSARF wurde gegen das 733 Basenpaare große S/MAR-Element M18 ausgetauscht (Abbildung 2.15; pEpi-FGM18F). So konnten pEpi-Derivate mit dem ursprünglichen S/MAR-Element SAR E und der größenreduzierten S/MAR M18 in CHO-K1-Zellen etabliert und verglichen werden. Die Plasmide pEpi-FGSARF mit der SAR E bzw. pEpi-FGM18F mit der S/MAR M18 wurden durch Lipofektion in CHO-K1-Zellen eingebracht und diese anschließend mit G418 selektiert.

Als zusätzliche Kontrolle und um einen Einfluss der Plasmidgröße auszuschließen, wurde außerdem der Vektor pMARS-egfp transfiziert (Jenke et al., 2004). Dieses pEpi-Derivat enthält anstelle der 2 kb großen SAR E aus dem humanen IFN- β -Gencluster ein Tetramer aus einem im SIDD-Profil stark destabilisierten, 155 bp langen Sequenzabschnitt der SAR E (entspricht dem invertierten Peak Nr. 2 in Abbildung 2.11). Durch Oligomerisierung dieser Sequenz wurde ein artifizielles S/MAR-Modul generiert. Diese sogenannte Tetramer-S/MAR hat eine Länge von

620 Basenpaaren, der Vektor pMARS-egfp ist somit mit 5,8 kb genauso groß wie pEpi-FGM18F (Abbildung 2.15).

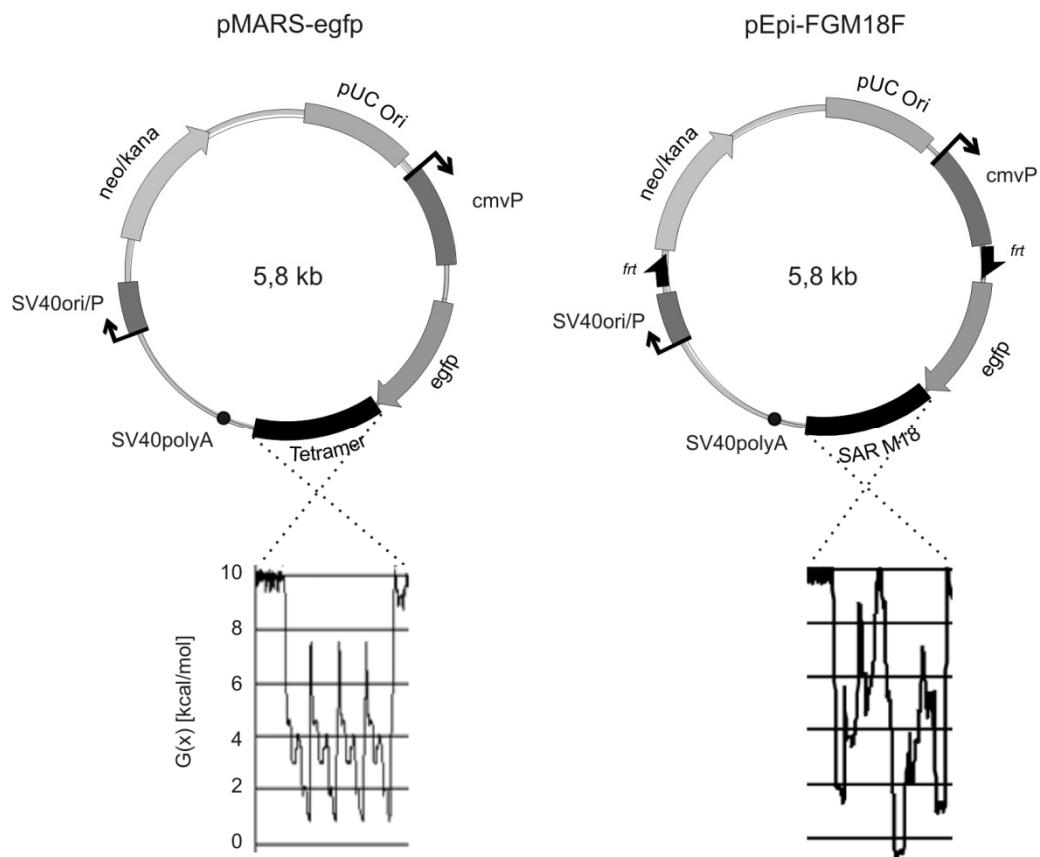


Abb. 2.15: Schematische Darstellung der Vektoren pMARS-egfp und pEpi-FGM18F

pMARS-egfp enthält anstelle der 2 kb großen SAR E aus dem humanen IFN- β -Gencluster ein Tetramer aus einem im SIDD-Profil stark destabilisierten, 155 bp langen Sequenzabschnitt der SAR E, hier schematisch dargestellt. pEpi-FGM18F basiert auf dem pEpi-Derivat pEpi-FGSARF. SAR E wurde gegen die S/MAR M18 ausgetauscht.

Über einen Kultivierungszeitraum von zwei Monaten unter Selektionsdruck wurden die Transgenexpression und der episomale Status der pEpi-Vektoren pEpi-FGSARF, pEpi-FGM18F und pMARS-egfp überprüft. Es wurden zwei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Hierbei war es nicht möglich, pEpi-FGSARF oder pMARS-egfp episomal in CHO-K1-Zellen zu etablieren (siehe auch 2.1.2). Abbildung 2.16 A zeigt eine Southern Blot-Analyse mit einer Sonde aus dem Bereich des eGFP-Gens von G418-selektierten Klongemischen vier Wochen nach Transfektion der Vektoren pEpi-FGM18F, pEpi-FGSARF und pMARS-egfp. Die Klongemische mit pEpi-FGSARF und pMARS-egfp zeigen im Southern Blot mehrere völlig unspezifische Banden als deutliches Indiz für *random integration* bei zusätzlichem Sequenz-Rearrangement der Vektorsequenzen im Verlauf der G418-

Selektion. Für pEpi-FGM18F kann neben zufällig verteilten Banden auch eine dominante Bande in der erwarteten Größe von 5,8 kb detektiert werden, was zeigt, dass dieser Vektor nicht im gleichen Ausmaß zu DNA-Rearrangements neigt wie pEpi-FGSARF und pMARS-egfp, also die S/MAR M18 eine verbesserte Stabilität der Vektorsequenz vermittelt.

Da offenbar alle Vektoren im Verlauf der G418-Selektion integrierten, konnte die Expression der verschiedenen Plasmide in ihrer episomalen Form nur transient und in den ersten zwei Wochen unter Selektionsdruck verglichen werden. Die Vektoren mit den verkürzten S/MAR-Elementen, pEpi-FGM18F und pMARS-egfp, zeigten hierbei überlegene Expressionseigenschaften gegenüber dem Vektor pEpi-FGSARF (Abbildung 2.16).

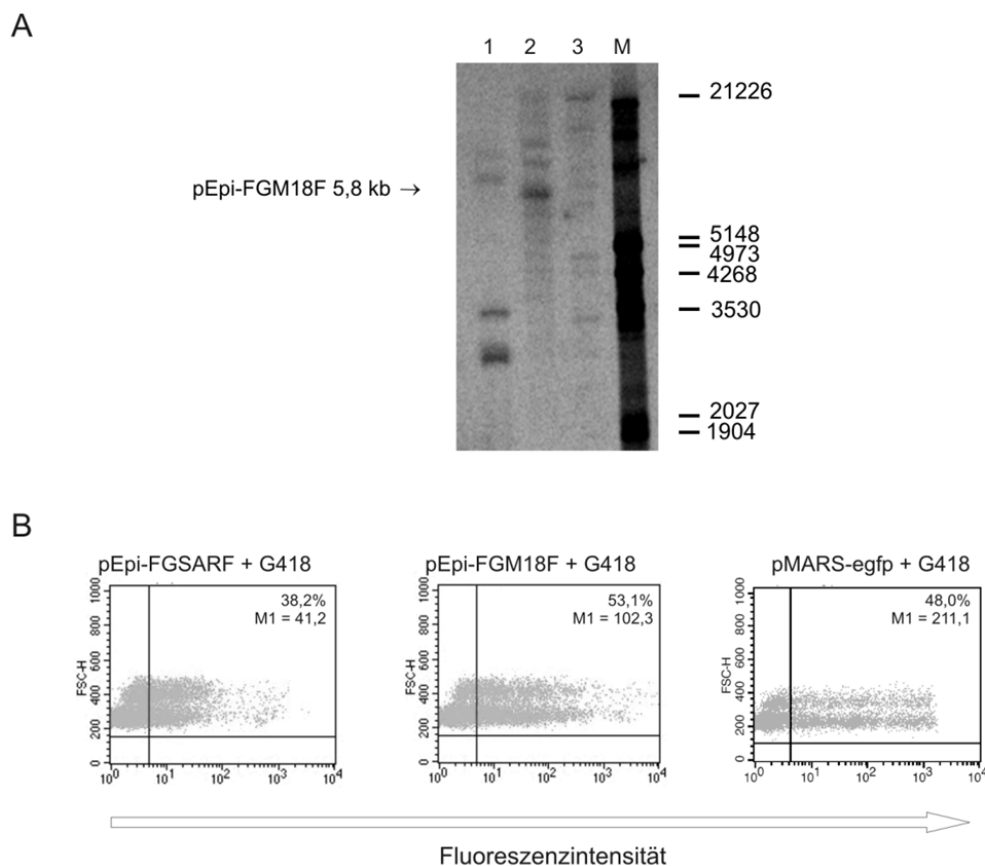


Abb. 2.16: Vergleich der pEpi-Derivate mit SAR E, S/MAR M18 und Tetramer-S/MAR

A: Southern Blot der isolierten Gesamt-DNA aus Klongemischen mit *egfp*-Sonde nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI (1, 2) bzw. *Spe*I (3). Es wurden 2 µg DNA/ 3×10^5 Zellen transfiziert und 14 Tage mit G418 selektiert. 1: pEpi-FGSARF (erwartet: 7,1 kb); 2: pEpi-FGM18F (5,8 kb); 3: pMars-egfp (erwartet: 5,8 kb). Marker: λ *Hind*III/*Eco*RI, S³⁵ markiert.

B: Untersuchung der eGFP-Expression durch FACS-Analyse der Klongemische nach 14 Tagen Selektion mit G418. FSC („forward scatter“) = Zellgröße. Der Prozentsatz der im rechten oberen Quadranten befindlichen Zellen ist angegeben ebenso wie die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen (M1).

Das Plasmid pMARS-egfp enthält keine Erkennungsstellen für die Flp-Rekombinase und kann daher bisher nicht zur Produktion von *Minicircles* benutzt werden. Die in den Southern Blot-Analysen verdeutlichte Instabilität dieses Vektors (Abbildung 2.16 A), möglicherweise durch den hohen Anteil repetitiver Sequenzen, spricht allerdings gegen den Einsatz der Tetramer-S/MAR in einem *Minicircle*-Vektor. Die S/MAR M18 zeigt sich hier deutlich überlegen bei fast identischer Größenreduktion im Vergleich zur ursprünglich verwendeten SAR E. Allerdings ist die Gegenwart prokaryotischer Sequenzen und der zur Etablierung der pEpi-Vektoren notwendige Selektionsdruck mit G418 in jedem Fall ungünstig, so dass auch diese Versuche dafür sprechen, zur genetischen Modifikation von Zellen ausschließlich *Minicircle*-Vektoren auf der Basis der größenreduzierten S/MAR M18 einzusetzen.

2.3.5 Untersuchung der transkriptionellen Termination in episomal replizierenden SAR E- und M18-Vektoren

Für den Prototyp eines episomal replizierenden Plasmids, pEpi, wurde die Notwendigkeit der aktiven Transkription des Gens *upstream* des S/MAR-Elements sowie eines Teils der S/MAR-Sequenz selbst gezeigt (Stehle et al., 2003; Nehlsen 2004). Ziel war es nun, herauszufinden, wo in episomal replizierenden Vektoren, die auf dem größenreduzierten S/MAR-Element basieren, die Termination der Transkription stattfindet.

Es wurde die Gesamt-RNA aus CHO-K1-Zellen isoliert. Es handelte sich hierbei um zweimal sortierte Klongemische des *Minicircle* SAR E und des *Minicircle* M18, sowie die G418-selektierten Klongemische von pEpi-FGSARF und pEpi-FGM18F zu Beginn der Kultivierung. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein G418-selektiertes Klongemisch von pMARS-egfp eingesetzt. Für diesen Vektor wurde gezeigt, dass die Transkription die SV40-Polyadenylierungsstelle 3' des artifiziellen S/MAR-Elements erreicht, also die S/MAR komplett von der zellulären Transkriptionsmaschinerie durchlaufen wird (Jenke et al., 2004).

Die RNA wurde in einem Northern Blot mit einer DNA-Sonde aus dem Bereich des eGFP-Gens hybridisiert. Für die Vektoren, die auf dem S/MAR-Element SAR E basieren, wurden mehrere, unterschiedlich lange *egfp*-Transkripte nachgewiesen (Abbildung 2.17). Es stellte sich nun die Frage, ob die größenreduzierte S/MAR M18 bis zum SV40-Polyadenylierungssignal 3' der S/MAR durchgehend transkribiert wird und eine reife mRNA entsteht, wie es die dominante Bande bei ca. 2,0 kb im Northern Blot vermuten lässt. Für die Transkription des eGFP-Gens in den SAR E-Vektoren wurde gezeigt, dass die Termination vermutlich an einer oder mehreren unbekannten Stellen in der SAR E-Sequenz und nicht am SV40-Polyadenylierungssignal 3' der S/MAR stattfindet (Stehle et al., 2003; Nehlsen, 2004).

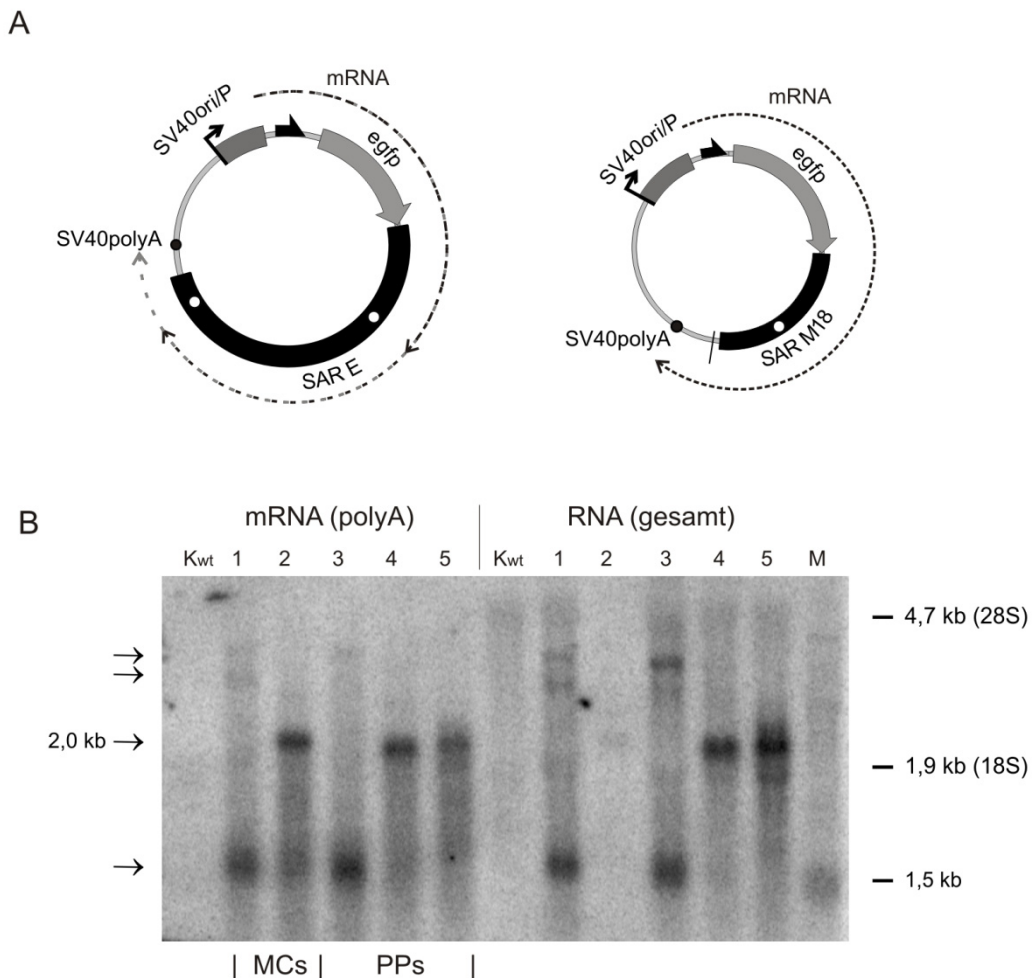


Abb. 2.17: Überprüfung der Termination der Transkription in episomal replizierenden Vektoren

A: Schematische Darstellung der *Minicircle*-Vektoren SAR E und M18. Die verschiedenen nachgewiesenen *egfp*-Transkripte sind eingezeichnet (gestrichelte Linien), ebenso wie die SV40-Polyadenylierungsstelle (schwarz) und die kryptischen Polyadenylierungssignale in den S/MAR-Sequenzen (weiß). Diese Darstellung gilt analog für die Vektoren pEpi-FGSARF und pEpi-FGM18F.

B: Northern Blot-Analyse der polyadenylierten mRNA sowie der Gesamt-RNA. Die RNA bzw. mRNA wurde mit einer *egfp*-Sonde hybridisiert. Die Größe der 18S und 28S-rRNA ist zur Orientierung auf ihrer Laufhöhe im Formaldehyd-Agarosegel eingezeichnet. Pfeile markieren die *egfp*-Transkripte. Kwt: Kontrolle, nichttransfizierte CHO-K1-Zellen; 1: *Minicircle* SAR E; 2: *Minicircle* M18; 3: pEpi-FGSARF; 4: pEpi-FGM18F; 5: pMARS-*egfp*; M: 0,5-10 kb RNA ladder (Invitrogen).

Um die Banden des Northern Blots besser zuordnen zu können, wurde zusätzlich ausschließlich polyadenylierte RNA isoliert und diese im Northern Blot mit der Gesamt-RNA verglichen. Diese Untersuchung ergab das gleiche Bandenmuster wie die Northern Blot-Analyse der Gesamt-RNA, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei allen generierten Banden um polyadenylierte *egfp*-mRNA unterschiedlicher Größe handelt (Abbildung 2.17). Es wurde daher mit Hilfe des

Programms „polyadq“ zur Identifizierung von humanen und murinen polyA-Signalen nach kryptischen Polyadenylierungssignalen in den Vektorsequenzen gesucht (Tabaska et al., 1999; http://rulai.cshl.org/tools/polyadq/polyadq_form.html). Diese polyA-Signale sind in Abbildung 2.17 eingezeichnet.

Für die Vektoren mit SAR E-Element liegt ein prozentual hoher Anteil der *egfp*-Transkripte als polyadenylierte mRNA von etwa 1,5 bis 1,6 kb Größe vor. Diese Transkriptgröße entspricht einem kryptischen Polyadenylierungssignal bei 450 bp in der SAR E, das mittels Sequenzanalyse bestimmt werden konnte (siehe auch Nehlsen, 2004). Außerdem zeigt der Northern Blot für den *Minicircle* SAR E sowie pEpi-FGSARF eine zusätzliche Doppelbande. Die untere der Banden entspricht der Termination an einer weiteren kryptischen Polyadenylierungsstelle bei 1720 bp in der SAR E, die in der größenreduzierten S/MAR nicht mehr vorhanden ist. Die obere Bande belegt eine Termination an der SV40-Polyadenylierungsstelle 3' der SAR E, und zeigt, dass die SAR E seltener auch komplett transkribiert wird.

Die Vektoren *Minicircle* M18 und pEpi-FGM18F sowie der Vektor pMARS-egfp zeigen im Northern Blot eine dominante Bande bei etwa 2,0 kb. Dies entspricht der Länge eines Transkripts vom Transkriptionsstartpunkt des Promoters bis zur SV40-Polyadenylierungsstelle *downstream* der jeweiligen S/MAR-Elemente. Obwohl ein weiteres, kryptisches polyA-Signal (nach 450 bp in der SAR) auch in der M18-Sequenz vorhanden ist, wird die Transkription der etablierten, M18-basierten Episomen offenbar bevorzugt an der SV40-Polyadenylierungsstelle 3' der SMAR terminiert (Abbildung 2.17).

Für den Vektor pEpi basierend auf der SAR E wurde gezeigt, dass die Inversion der Transkriptionseinheit oder das Einfügen eines Polyadenylierungssignals zwischen *egfp*-Gen und S/MAR-Element zu Verlust oder Integration des Vektors führen (Nehlsen, 2004; Stehle et al., 2003). Es ist davon auszugehen, dass die überlegenen Eigenschaften des *Minicircles* M18, wie höhere Transgenexpression und episomale Stabilität, zumindest teilweise auf die stärkere Destabilisierung des SV40-Promotors (Abbildung 2.11) sowie eine vollständige Transkription des größenreduzierten S/MAR-Elements M18 zurückzuführen sind (siehe auch Diskussion 3.2). Aus den hier dargestellten Versuchen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der *Minicircle* M18 allen anderen episomalen Vektorkonstrukten überlegen ist.

2.4 Konzeption, Produktion und Charakterisierung eines industriell hergestellten, episomal replizierenden *Minicircle*-Vektors

Auf der Grundlage der bisherigen Ergebnisse sollte ein episomal replizierender *Minicircle* mit bestmöglichen Sequenzeigenschaften kloniert und anschließend im Rahmen einer Kooperation von der Firma PlasmidFactory GmbH, Bielefeld, als hochreine *supercoiled Minicircle*-DNA produziert werden. Diese *Minicircle*-DNA sollte nach *in vitro*-Tests in Zelllinien auch weiteren Kooperationspartnern für *in vivo*-Anwendungen, wie die Generierung transgener Mäuse, zur Verfügung gestellt werden (siehe auch Diskussion 3.5.2).

Die gewünschte *Minicircle*-Sequenz, bestehend aus SV40-Promoter/Replikationsursprung, dem *egfp*-Gen und dem S/MAR-Element M18, wurde zunächst in ein Parentalplasmid kloniert, welches das ParA-Resolvase-Gen unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promoters und ParA-Erkennungsstellen trägt. Die Rekombinationseffizienz wird hierbei mit 99,6% angegeben, wobei ausschließlich DNA-Monomere und keine Multimere entstehen. Die anschließende Affinitätschromatografie beruht auf der Bindung eines LacO *tandem repeat* im *Minicircle* an einer Säule mit immobilisierten LacI-Repressor (Abbildung 2.18; Mayrhofer et al., 2008). Der so produzierte *Minicircle* PF-M18 ist 2,7 kb groß und enthält im Gegensatz zum *Minicircle* M18 eine doppelte LacO-Sequenz sowie eine nach der Rekombination verbleibende ParA-Erkennungsstelle, also zusätzliche Sequenzen, die möglicherweise einen Einfluss auf die S/MAR-vermittelte episomale Stabilität haben könnten. Daher wurde PF-M18 zunächst mit dem herkömmlich hergestellten *Minicircle* M18 verglichen.

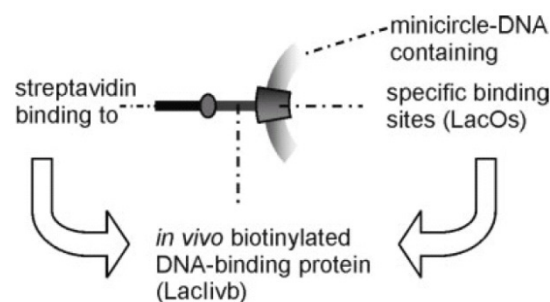


Abb. 2.18: RBPS-Chromatografie-Prinzip (Mayrhofer et al., 2008)

Die RBPS (*recombination based plasmid separation*)-Technologie umfasst zwei Schritte: Zunächst werden durch intramolekulare Rekombination des Parentalplasmids mittels der ParA-Resolvase *Minicircle* und Miniplasmid voneinander getrennt. Anschließend wird die *Minicircle*-DNA über eine Protein/DNA-Affinitätschromatografie aufgereinigt (hier dargestellt). LacO: Lactose-Operator; LacIvB: *in vivo*-Biotinylierungssequenz fusioniert mit dem LacI-Protein; LacI: Lactose-Repressor.

2.4.1 Vergleich der mittels unterschiedlicher Herstellungsverfahren erzeugten *Minicircle*-Vektoren

Die Transfektionseffizienz der *Minicircle*-Vektoren M18 und PF-M18 wurde in CHO-K1-Zellen überprüft. Um eine Vergleichbarkeit zu schaffen, wurde zunächst die Konzentration der gelaufgereinigten *Minicircle*-DNA M18 mittels Gelelektrophorese bestimmt (Daten nicht gezeigt) und die *Minicircle*-DNA PF-M18 entsprechend verdünnt. Eine zwei Tage nach der Transfektion durchgeführte FACS-Analyse zeigt einen höheren Anteil transient exprimierender Zellen (TEX) für die *Minicircle*-DNA PF-M18 (im Mittel 52% bzw. 36%; Abbildung 2.19).

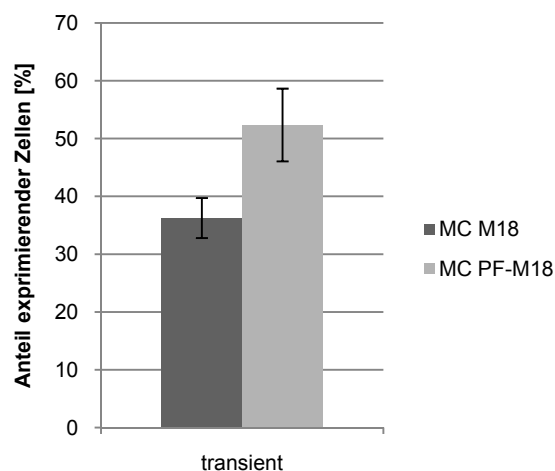


Abb. 2.19: Transiente eGFP-Expression der *Minicircle*-DNA

Dargestellt ist der prozentuale Anteil eGFP-exprimierender Zellen zwei Tage nach der Transfektion von *Minicircle*-DNA M18 bzw. PF-M18. Am Vortag auf 6-Loch-Platten ausgesäte Zellen (3×10^5) wurden mit jeweils 250 ng MC-DNA pro Loch transfiziert.

Die eGFP-exprimierenden Zellen wurden nach sechs Tagen mittels Sortierung im FACS angereichert. Die Etablierungsrate (als Prozentsatz stabil exprimierender Zellen der TEX) liegt für die gelaufgereinigte *Minicircle*-DNA M18 bei 2 % und für PF-M18 bei 1,3 %. Aufgrund der deutlich höheren Transfektionseffizienz des *Minicircle* PF-M18 ist der prozentuale Anteil stabil eGFP-exprimierender Zellen äquivalent (Abbildung 2.20). Die durchschnittliche eGFP-Expressionshöhe (mittlere Fluoreszenzintensität) der sortierten Klongemische ist für beide *Minicircle*-Vektoren nahezu identisch (Daten nicht gezeigt).

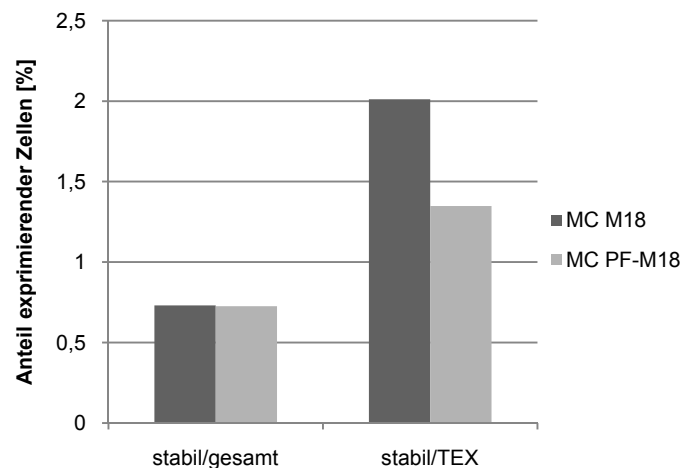


Abb. 2.20: Etablierungsrate

Dargestellt ist der prozentuale Anteil stabil eGFP-exprimierender Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl (stabil/gesamt) bzw. den Anteil der transient eGFP-exprimierenden Zellen (stabil/TEX). Es handelt sich um Mittelwerte aus je zwei parallelen Transfektionen.

Die Southern Blot-Analyse der isolierten Gesamt-DNA mit einer *egfp*-Sonde zeigt sowohl für die Klongemische von *Minicircle* M18 als auch *Minicircle* PF-M18 eine Bande bei knapp 3,0 kb (Abbildung 2.21), was auf den episomalen Status des industriell hergestellten *Minicircles* PF-M18 hinweist.

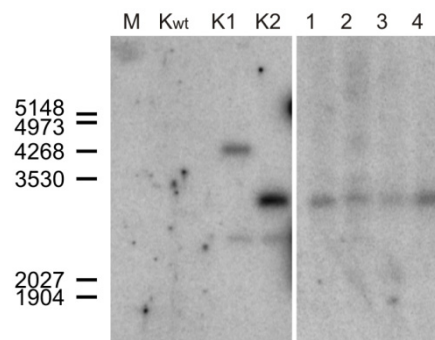


Abb. 2.21: Überprüfung des episomalen Status von MC M18 und MC PF-M18

Southern Blot-Analyse von Klongemischen mit *Minicircle* M18 (1, 2) und *Minicircle* PF-M18 (3, 4). Verdau der isolierten Gesamt-DNA mit *Bam*HI und Hybridisierung mit einer *egfp*-Sonde. Kwt: Kontrolle, DNA aus nichttransfizierten CHO-K1; K1: Kontrolle + 100 pg linearisierte *Minicircle*-DNA SAR E 4,1 kb; K2: Kontrolle + 100 pg linearisierte *Minicircle*-DNA M18 2,9 kb; Marker: λ *Hind*III/*Eco*RI, S³⁵ markiert.

Der industriell produzierte *Minicircle* PF-M18 weist demnach, wie auch der mittels Flp-Rekombination und Gelaufreinigung hergestellte *Minicircle* M18, eine stabile

Transgenexpression auf und wird über den hier beobachteten Kultivierungszeitraum von 2,5 Monaten stabil repliziert. Die Etablierungsrate des PF-M18 bezogen auf die transient eGFP-exprimierenden Zellen lag in diesen ersten Versuchen niedriger als die für M18. Die bessere DNA-Qualität ermöglichte allerdings eine höhere Transfektionseffizienz in CHO-K1-Zellen, so dass der Anteil stabil exprimierender Zellen identisch war.

2.5 Transfektionseffizienz und Etablierungsrate eines *Minicircle*-Vektors in Abhängigkeit von Zellzyklusphase und Chromatinstruktur

Ziel dieses Teiles der vorliegenden Arbeit war es, einen Einblick in den noch unklaren Etablierungsmechanismus episomal replizierender *Minicircle*-Vektoren zu erhalten. Zur geplanten genaueren Untersuchung des Etablierungsmechanismus‘ des *Minicircle*-Vektors waren größere DNA-Mengen nötig, die mit dem geschilderten Gelaufreinigungsverfahren (Nehlsen et al., 2006) aufgrund der relativ geringen Ausbeute nicht hergestellt werden können. Hier wurde daher der industriell hergestellte *Minicircle* PF-M18 eingesetzt. Zwar ist der *Minicircle*-Vektor im Gegensatz zu seinem Prototyp, dem Plasmid pEpi, ohne Selektionsdruck in sich teilenden Zellen etablierbar (diese Arbeit; Nehlsen, 2006). Nach der transienten Expressionsphase kommt es aber zu einem starken Rückgang des Anteils eGFP-exprimierender Zellen, der in CHO-K1 und NIH3T3 auf einen Verlust des Vektors bei der Zellteilung und nicht auf epigenetische Inaktivierung zurückzuführen ist (Nehlsen et al., 2006). Zwischen 0,5% und 5% der transfizierten CHO-K1-Zellen, die eine transiente Expression aufweisen, zeigen auch eine stabile Transgenexpression und replizieren den Vektor episomal. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der Transfektion sowie die strukturellen Veränderungen des Chromatins durch Histon-Hyperacetylierung einen Einfluss auf die Etablierungsrate des *Minicircle*-Vektors haben. CHO-K1-Zellen wurden hierzu mit zwei verschiedenen Methoden synchronisiert: zum einen durch die Zugabe der kurzkettigen Fettsäure Natrium-Butyrat zum Kulturmedium, zum anderen durch Kontaktinhibition.

Butyrat induziert über die nicht-kompetitive und reversible Hemmung von Histondeacetylasen (HDACs) eine Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 und somit eine Auflockerung des Chromatins, die transkriptionelle Aktivierung von bestimmten Genen und eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase (Cousens et al., 1978; Yoshida et al., 1990; Schlake et al., 1994). Ein Aussäen in Medium ohne Butyrat-Zugabe führt zu einem synchronen Eintritt der Zellen in den Zellzyklus.

Um unterscheiden zu können, ob Butyrat die Expression und Etablierung des *Minicircles* durch Histon-Hyperacetylierung oder durch die Synchronisation der Zellen beeinflusst, wurde mit der Methode des *confluence blocks*, also der Synchronisation der Zellen durch Kontaktinhibition, ein alternatives Synchronisationsprinzip gewählt. Kontaktinhibition bezeichnet den durch Zell-Zell-Kontakte vermittelten Wachstumsstopp (Holley und Kiernan, 1968; Abercrombie, 1970), der in einem Arrest in der G0/G1-Phase des Zellzyklus resultiert. Zwar ist die Fähigkeit zur Kontaktinhibition in einer transformierten Zelllinie wie CHO-K1 nur eingeschränkt vorhanden, aber ein Großteil der Zellen kann durch Wachstum in der Kulturschale bis zur maximalen Konfluenz in der G0/G1-Phase arretiert werden (Davis et al., 2001; Grosjean et al., 2002). Auch diese Zellen können dann durch erneutes Aussäen in niedriger Zelldichte wieder in den Zellzyklus entlassen werden.

2.5.1 Synchronisation von CHO-K1-Zellen und Transfektion in verschiedenen Zellzyklusphasen

Um einen Zellzyklusarrest durch Kontaktinhibition zu erzielen, wurden die CHO-K1-Zellen nicht passagiert, bis in der Kulturschale ein vollständig dichter Zell-*monolayer* erreicht war. Zur Synchronisation mit Butyrat wurden fast konfluente CHO-K1-Zellen für 36 Stunden in Kulturmedium mit Zusatz von 5 mM Natrium-Butyrat inkubiert. Mittels FACS-Analyse wurde der erfolgreiche Arrest der Zellen in der G0- bzw. G1-Phase kontrolliert (Abbildung 2.22).

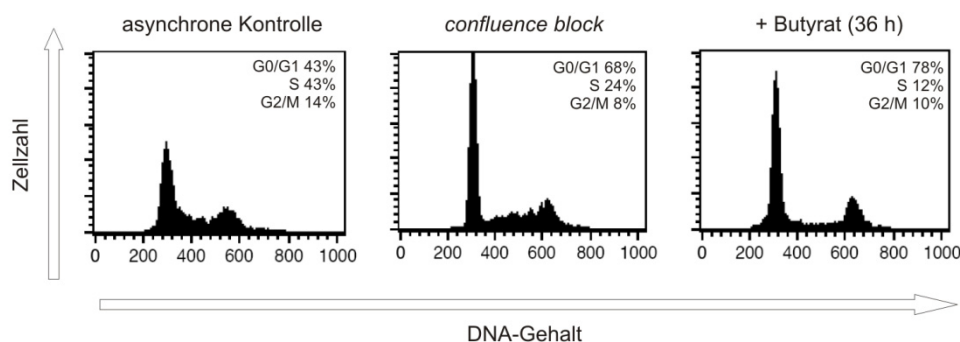


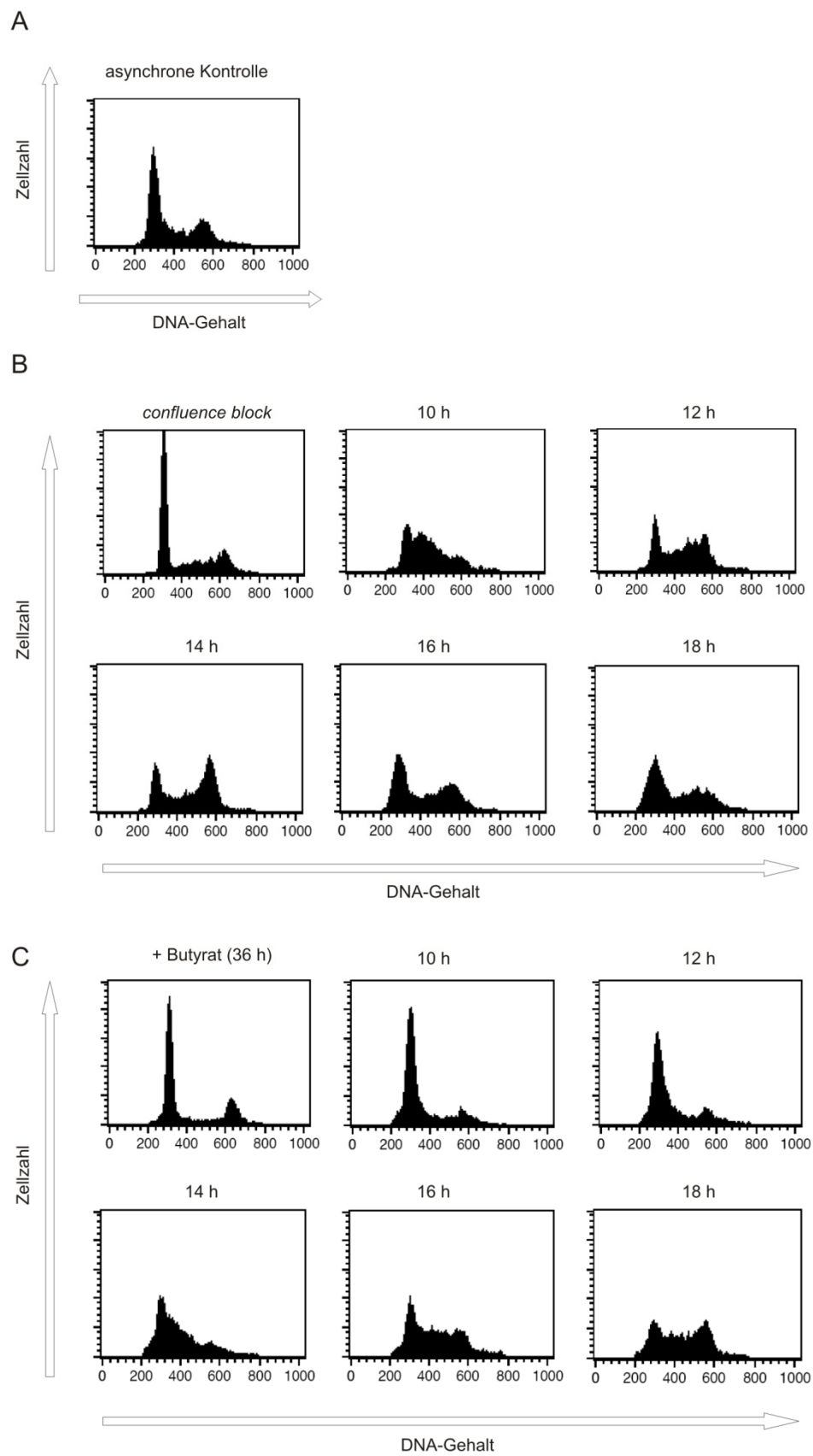
Abb. 2.22: Synchronisation von CHO-K1-Zellen

Zur Bestimmung der Verteilung auf die Zellzyklusphasen wurden die Zellen geerntet, permeabilisiert und mit Propidiumjodid (PI) gefärbt. Anschließend wurde der DNA Gehalt der Zellen im FACS analysiert. Der erste Peak (~300) entspricht hier der G0/G1-Phase, der zweite der G2/M-Phase (~600). Die Zellen in der S-Phase liegen zwischen diesen beiden Peaks.

Die mittels *confluence block* bzw. Butyrat synchronisierten Zellen wurden in einem Abstand von zwei Stunden in frischem Medium ausgesät. Nach zehn bis 18 Stunden ab Wiedereintritt in den Zellzyklus wurde je die Hälfte der Zellen zeitgleich per Lipofektion mit *Minicircle*-DNA PF-M18 transfiziert, die andere Hälfte fixiert. Diese fixierten Zellen dienten zur Bestimmung der prozentualen Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen zum Zeitpunkt der Transfektion mittels FACS-Messung.

Abb. 2.23: FACS-Analysen der synchronisierten CHO-K1-Zellen

A: FACS-Analyse der asynchronen Kontrolle (logarithmisch wachsende Zellen), siehe auch Abb.2.21.
B: FACS-Analysen der mit *confluence block* synchronisierte CHO-K1. Bestimmung der Verteilung auf die Zellzyklusphasen im 2 h-Rhythmus ab 10 h nach dem Aussäen und Wiedereintritt in den Zellzyklus.
C: Mittels 5 mM Na-Butyrat synchronisierte CHO-K, analog zu B.



Die FACS-Analyse zeigte, dass zehn Stunden nach dem Aussäen über 70% der durch Kontaktinhibition synchronisierten Zellen die frühe S-Phase erreicht haben. Nach 18 Stunden entsprechen die prozentualen Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen etwa wieder denen der logarithmisch wachsenden Kontrolle (Abbildung 2.23 und 2.24). Die mit Butyrat behandelten Zellen sind nach zehn Stunden noch überwiegend (74%) in der G1-Phase arretiert und treten erst nach 14 Stunden in die S-Phase ein. Insgesamt ist der prozentuale Anteil, der synchron die S-Phase durchquert, nach Behandlung mit Butyrat geringer, was darauf hindeuten kann, dass ein Teil der Zellen irreversibel in G0/G1 geblockt ist (Abbildung 2.24). Nach 24 bis 36 Stunden entspricht die Verteilung der Zellen wieder der Kontrolle ohne Butyrat-Behandlung (Daten nicht gezeigt).

Somit ließen sich CHO-K1-Zellen erfolgreich mittels *confluence block* bzw. Natrium-Butyrat synchronisieren, wobei die mit Butyrat behandelten Zellen etwa vier bis sechs Stunden länger in der G1-Phase arretiert blieben und erst dann in einen erneuten Zellzyklus eintraten. Nach 18 Stunden nahm der Anteil Zellen in der S-Phase wieder ab. (Abbildung 2.24 und Daten nicht gezeigt).

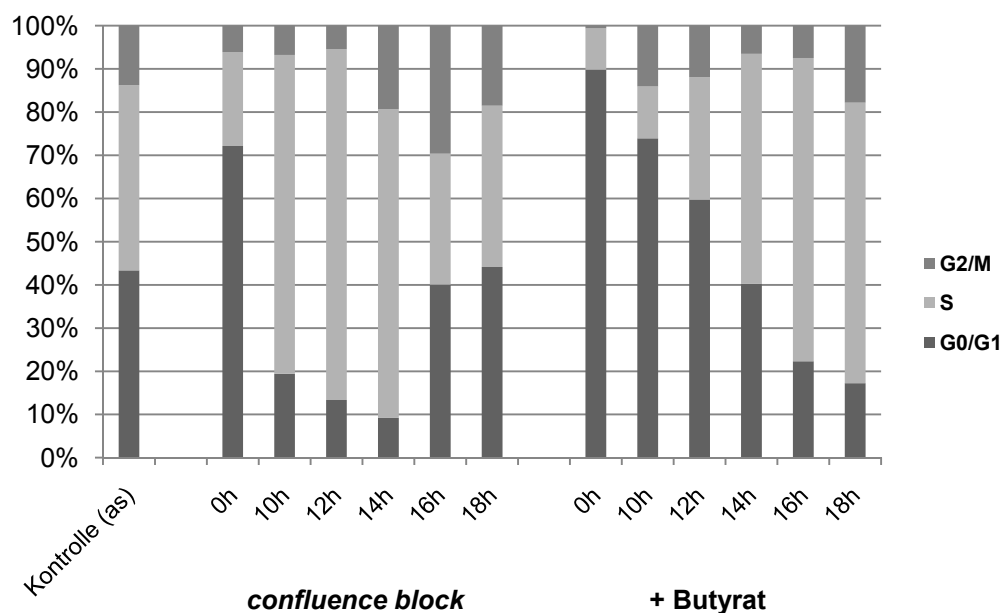


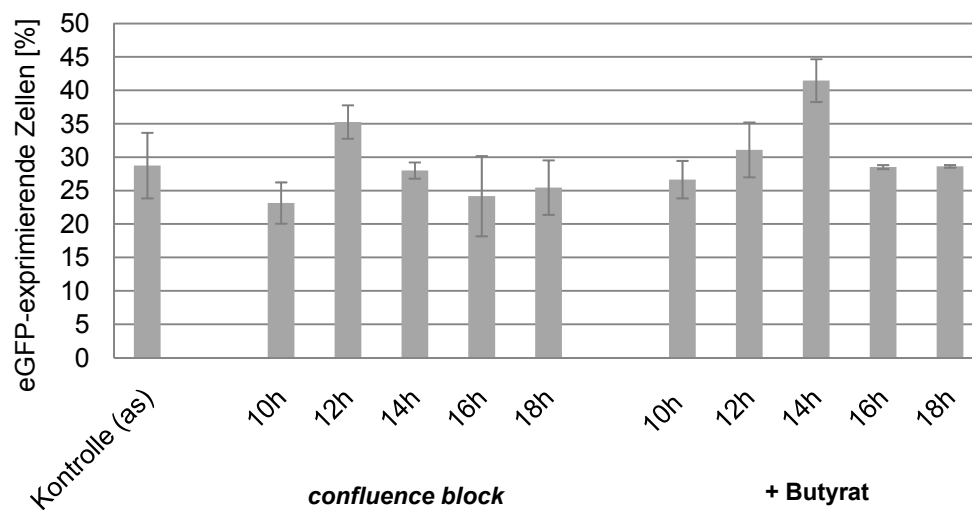
Abb. 2.24: Synchroner Zellzyklus von CHO-K1-Zellen nach *confluence block* bzw. Butyrat-Behandlung

Analyse und Berechnung der prozentualen Anteile der Zellen in den Zellzyklusphasen erfolgte mit dem Programm 'ModFit'. Kontrolle (as): logarithmisch wachsende Zellen.

2.5.2 Einfluss der Zellzyklusphase und der Chromatinstruktur auf die transiente Expression von *Minicircle*-DNA

48 Stunden nach der Transfektion der *Minicircle*-DNA PF-M18 wurde eine FACS-Analyse durchgeführt und der Anteil transient eGFP-exprimierender Zellen bestimmt (Abbildung 2.25 A). Es wurden zwei Versuchsreihen mit doppeltem Ansatz durchgeführt. In den folgenden Abbildungen sind die Mittelwerte einer Versuchsreihe dargestellt.

A



B

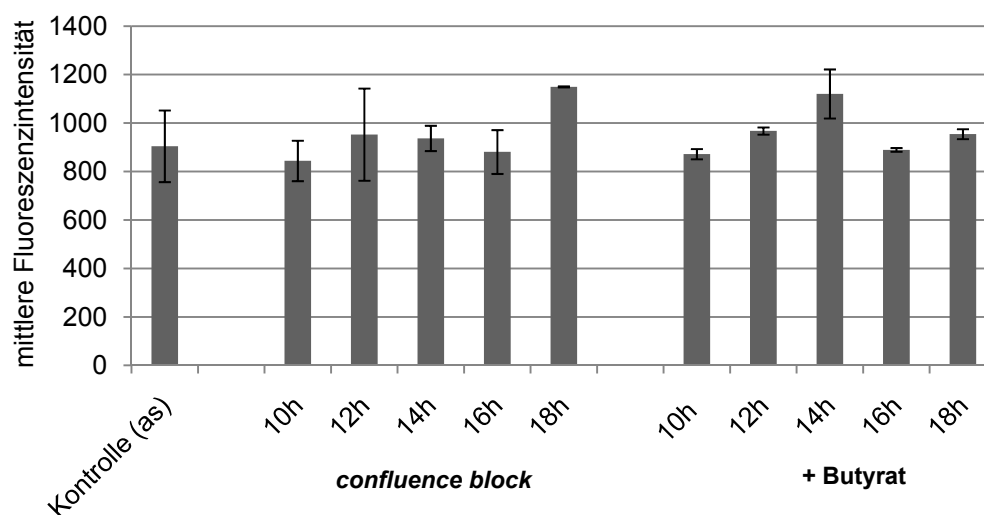


Abb. 2.25: Anteil und Expressionslevel transient eGFP-exprimierender Zellen nach Transfektion zu verschiedenen Zellzyklusphasen

A: Die synchronisierten Zellen wurden 10 bis 18 h nach dem Entlassen aus dem Zellzyklusarrest mittels Lipofektion mit 1 µg PF-M18 transfiziert. 48 h später wurde die transiente eGFP-Expression im FACS gemessen.

B: Mittlere Fluoreszenzintensität (*mean* M1) der Zellen 48 h nach der Transfektion mit PF-M18.

Über die gesamte Messreihe korreliert der Anteil transienter Expressierer für die durch *confluence block* synchronisierten Zellen mit dem Anteil der Zellen in der mittleren und späten S-Phase zum Zeitpunkt der Transfektion ($r = 0,85$). Der höchste Prozentsatz transient eGFP-exprimierender Zellen wurde mit 35,3% zwölf Stunden nach dem Aussäen erzielt, einem Zeitpunkt, an dem insgesamt über 80% der Zellen in der S-Phase vorliegen, davon dreiviertel in der mittleren und späten S-Phase (S2 und S3, siehe Abbildung 2.26). Der Wert der Kontrolle beträgt im Mittel 29%.

Für die mit Butyrat behandelten Zellen lässt sich diese Korrelation nicht feststellen. Der mit 41,5 (+3)% höchste Anteil eGFP-exprimierender Zellen wurde bei Transfektion 14 Stunden nach Wegnahme des Butyrats erzielt, außerdem ein leicht erhöhter Wert nach zwölf Stunden. Die Prozentsätze der übrigen Zeitpunkte ähneln dem Wert der Kontrolle. Die vorherige Synchronisation mit Butyrat hat nur einen geringen Einfluss auf die mittlere Fluoreszenzintensität der transient exprimierenden Zellen (Abbildung 2.25 B)

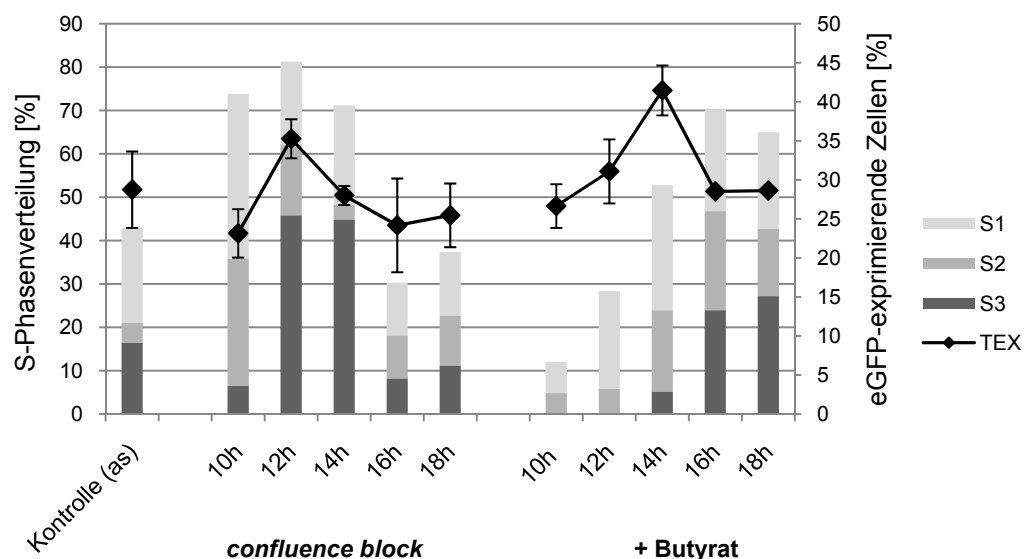


Abb. 2.26: Prozentsatz transient exprimierender Zellen sowie Anteil und Verteilung der Zellen in der S-Phase

Anteile der Zellen in der S-Phase zum Zeitpunkt der Transfektion und ihre Verteilung auf frühe, mittlere und späte S-Phase (S1 bis S3) im Vergleich mit dem Anteil transienter Expressierer (TEX). Die Analyse der Verteilung der Zellen in der S-Phase erfolgte mit dem Programm 'ModFit'.

2.5.3 Einfluss der Zellzyklusphase und der Chromatinstruktur auf die Etablierung des episomal replizierenden *Minicircle*-Vektors

Sieben Tage nach der Transfektion der synchronisierten Zellen wurden eGFP-exprimierende Zellen durch eine Sortierung im FACS angereichert. In den folgenden

drei Wochen wurde der Anteil stabil eGFP-exprimierender Zellen in den sortierten Klongemischen mit mehreren FACS-Messungen bestimmt (Abbildung 2.27).

Der Anteil stabil exprimierender Zellen in der Kontrolle liegt bei 2,7%. Bei den durch *confluence block* synchronisierten Zellen liegt der Anteil stabil exprimierender Zellen bei 1,8% bis 3%, wobei der höchste Wert für den Transfektionszeitpunkt 14 Stunden nach Aussäen erzielt wurde. Zu diesem Zeitpunkt war ein Großteil der Zellen am Übergang von der S-Phase zu G2/M (Abbildung 2.23 und 2.24). Der Transfektionszeitpunkt, mit dem die beste Etablierung der *Minicircle*-DNA erreicht wurde, ist also nicht identisch mit dem Zeitpunkt für die beste transiente Expression des Transgens (14 Stunden vs. 12 Stunden). Der Unterschied zur logarithmisch wachsenden Kontrolle ist nicht signifikant.

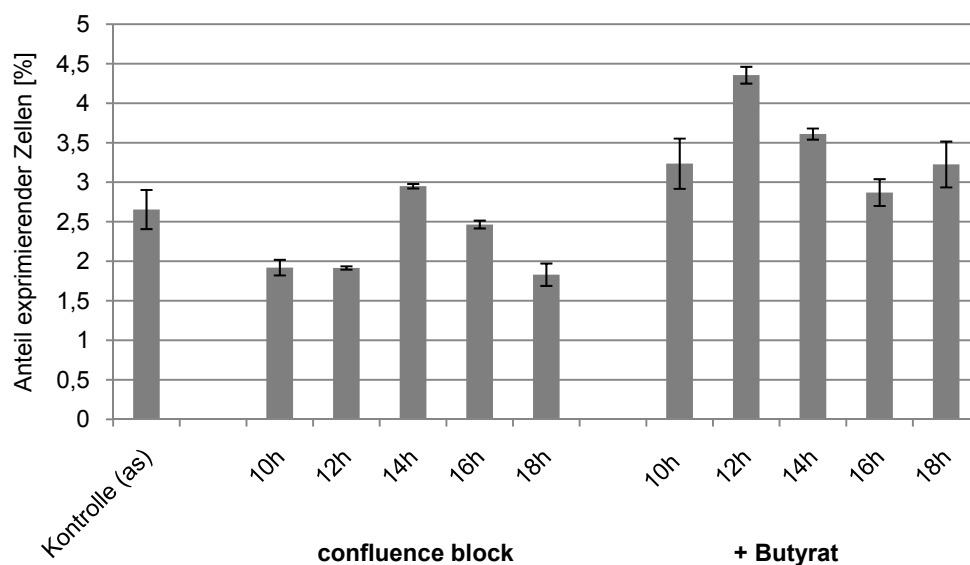


Abb. 2.27: Anteil stabil eGFP-exprimierender Zellen nach einer Sortierung im FACS

Sieben Tage nach der Transfektion der synchronisierten Zellen wurden eGFP-Exprimierer durch Sortierung am FACS angereichert. Der Anteil stabil exprimierender Zellen in diesen Klongemischen wurde in den folgenden Wochen durch regelmäßige FACS-Messungen bestimmt.

Bei Butyrat-behandelten Zellen ist der Anteil Zellen mit stabiler eGFP-Expression im Mittel höher als bei den durch *confluence block* synchronisierten Zellen und liegt zwischen 2,9% und 4,4% (Abbildung 2.27). Die Etablierungsrate ist bei Transfektion 12 Stunden nach Entfernen des Butyrats am höchsten, wenn ein Großteil der Zellen in die frühe S-Phase eintritt bzw. an der Schwelle zwischen G1- und S-Phase steht (Abbildung 2.23 und 2.24). Auch hier ist der Zeitpunkt für die beste transiente Genexpression ein anderer (12 Stunden vs. 14 Stunden). Allerdings kann möglicherweise eine niedrigere Etablierungsrate durch eine höhere Transfektionseffizienz ausgeglichen werden, so dass bei hoher Transfektionseffizienz ein ähnlich hoher Anteil stabil eGFP-exprimierender Zellen erreicht werden kann (Abbildung 2.28).

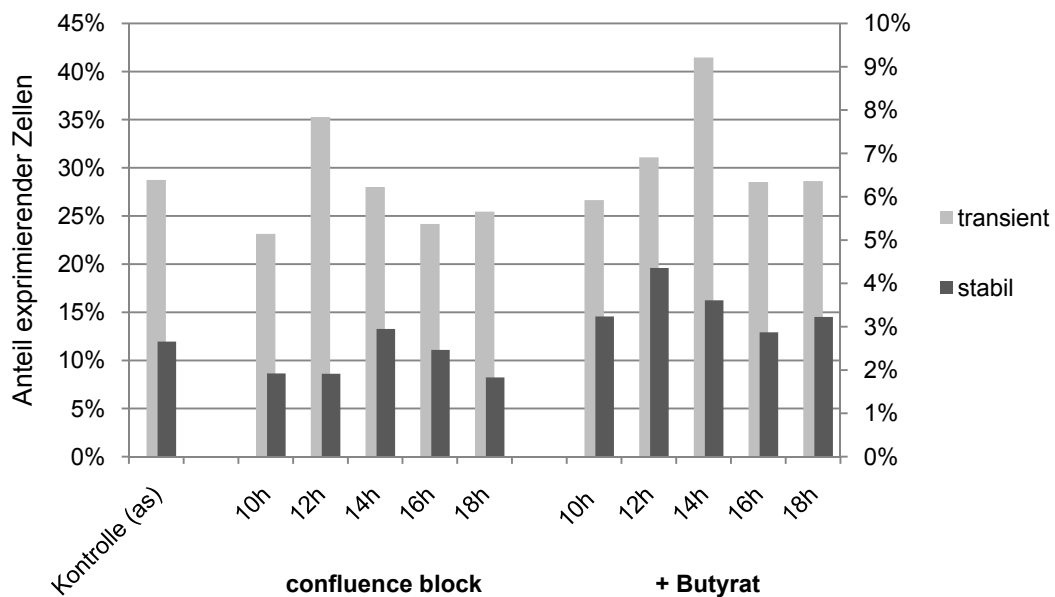


Abb. 2.28: Verhältnis transienter zu stabilen eGFP-Expriemern

Dargestellt ist hier der prozentuale Anteil transienter bzw. stabiler eGFP-Expriemern der synchronisierten Zellpopulationen. Ein hoher Anteil transienter Expriemern resultiert nicht zwangsläufig in einem hohen Anteil stabil eGFP-expriemender Zellen.

Die vorliegenden Versuche zeigen den positiven Einfluss einer Butyrat-Behandlung der Zellen vor der Transfektion auf die Etablierungsrate des episomal replizierenden *Minicircles* PF-M18. Während ohne Butyrat synchronisierte Zellen bei Transfektion in der späten S-Phase bzw. am Übergang S – G2/M eine geringfügig höhere Expressions- und Etablierungsrate zeigen als bei Transfektion zu anderen Phasen des Zellzyklus, ist diese Korrelation bei Butyrat-behandelten Zellen nicht mehr vorhanden. Der Grund für die deutlich höhere Etablierungsrate des *Minicircles* in Butyrat-behandelten Zellen dürfte daher in der Histon-Hyperacetylierung und der damit verbundenen strukturellen Veränderung des Chromatins liegen.

3. Diskussion

Die Nachteile viraler Vektoren und der damit verbundene Mangel an sicheren Vektorsystemen für gentherapeutische Anwendungen verstärkten die Bemühungen, nicht-virale Alternativen für den Einsatz in eukaryotischen Zellen zu entwickeln. Als Durchbruch wird hier die Entwicklung von zirkulären, episomal replizierenden Plasmiden gesehen, die nicht ins Genom der Wirtszelle integrieren. Der bereits in verschiedenen Zelllinien etablierte Vektor pEpi-eGFP stellt den Prototyp eines solchen Vektors dar. Allerdings kam es in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie zu einem Rückgang der Transgenexpression durch die epigenetische Inaktivierung von Vektorsequenzen (Nehlsen et al., 2006; Papapetrou et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein auf dem episomal replizierenden Vektor pEpi-eGFP basierender *Minicircle*, in dem prokaryotische Sequenzen und der Resistenzmarker deletiert wurden, in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien etabliert werden kann. Die Etablierung der *Minicircle*-Vektoren ist, im Gegensatz zu dem Prototyp eines nicht-viralen, replizierenden Episoms, dem Plasmid pEpi und seiner Derivate, ohne Selektionsdruck möglich. Zur episomalen Replikation ist demnach nur eine aktive Transkriptionseinheit in Kombination mit einem S/MAR-Element erforderlich. Das notwendige S/MAR-Element wurde durch ein S/MAR-internes Deletionereignis in seiner Größe reduziert. Die resultierende, 733 bp große S/MAR-Sequenz vermittelte in *Minicircle*- und pEpi-Vektoren eine erhöhte episomale Stabilität und Transgenexpression im Vergleich zur ursprünglich verwendeten SAR E von ca. 2 kb.

Nach der Transfektion der *Minicircle*-DNA nimmt der Anteil eGFP-exprimierender Zellen stark ab, was auf die mitotische Instabilität des *Minicircle*-Vektors in einem großen Anteil der Zellen zurückzuführen ist. Nach dieser Etablierungsphase können die stabil exprimierenden Zellen durch eine ein- bis zweimalige Sortierung mittels FACS angereichert werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung des Mechanismus der Etablierung und die Verbesserung der Etablierungsrate durch die Transfektion von synchronisierten Zellen in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus sowie unter dem Einfluss des Histon-Deacetylase-Inhibitors Butyrat.

3.1 Die Deletion der prokaryotischen Sequenzen verbessert die Eigenschaften eines nicht-viralen replizierenden Episoms

Die Entfernung der prokaryotischen Plasmidsequenzen von pEpi einschließlich des Selektionsmarkers mittels sequenzspezifischer Rekombination in *E. coli* überträgt das Konzept der sogenannten *Minicircles* als neuartigen Vektortyp (Darquet et al., 1997 und 1999; Bigger et al., 2001; Chen et al., 2003) auf nicht-virale, replizierende Episomen. Eine weitere Möglichkeit, allerdings keine gleichwertige Alternative zum

Minicircle-Konzept, stellen Plasmide ohne Antibiotikumresistenzgen dar, sogenannte pFAR-Plasmide (*plasmids Free of Antibiotic Resistance genes*; Marie et al., 2008). Der zur Produktion dieser Plasmide verwendete *E. coli*-Stamm trägt eine Amber-Mutation im Thymidylatsynthase-Gen, also ein Stopcodon im Leseraster des Gens, was zu einer Thymidin-Auxotrophie führt. pFAR-Plasmide kodieren anstatt für ein Antibiotikumresistenzgen für eine Amber-Suppressor-tRNA, die an das Stopcodon bindet, so dass die Translation der Thymidylatsynthase-mRNA und damit ein normales Wachstum der *E. coli*-Bakterien möglich wird. pFAR-Plasmide benötigen selbstverständlich neben der Sequenz für die Amber-Suppressor-tRNA einen prokaryotischen Replikationsursprung. *Minicircle*-Vektoren, wie auch die in dieser Arbeit hergestellten und untersuchten S/MAR-basierten *Minicircles*, bestehen dagegen nur aus eukaryotischen Sequenzen und sind völlig frei von Sequenzen bakteriellen Ursprungs und den damit verbundenen Nachteilen.

3.1.1 Die Anreicherung stabil exprimierender und replizierender Zellen ist ohne Selektionsdruck möglich

Die für die Etablierung des nicht-viralen, episomal replizierenden Plasmids pEpi notwendige Selektion mit G418 ist für gentherapeutische Anwendungen, wie zum Beispiel die *ex vivo* Modifikation von primären hämatopoetischen Stammzellen mit anschließender Re-Implantation, nicht durchführbar. Der in dieser Arbeit charakterisierte, S/MAR-basierte *Minicircle*-Vektor ist hingegen ohne Selektionsdruck in mehreren, schnellteilenden Zelllinien etablierbar.

Das S/MAR-Element des Vektors pEpi-eGFP ist für die Assoziation mit mitotischen Chromosomen bei der Zellteilung verantwortlich. Diese Assoziation wird durch das Kernmatrix-Protein SAF-A vermittelt. Das S/MAR-Element ist somit für die episomale Replikation und den Erhalt des Vektors zwingend erforderlich, wie an Untersuchungen mit pEpi-eGFP gezeigt wurde (Baiker et al., 2000; Jenke et al., 2004). Es ist anzunehmen, dass für einen auf pEpi-eGFP basierenden *Minicircle*-Vektor das gleiche gilt. Für den Vektor pEpi wurde mehrfach gezeigt, dass er nur episomal erhalten und repliziert wird, wenn eine aktive Transkription des Gens *upstream* des S/MAR-Elements mit partieller Transkription der S/MAR-Sequenz stattfindet (Stehle et al., 2003; Nehlsen, 2004). Die Transkription des Vektors pEpi und damit auch die stabile episomale Replikation ist jedoch von einem (initialen) Selektionsdruck abhängig. Für pEpi-eGFP und seine Derivate wurde gezeigt, dass bei Wegnahme des Selektionsdrucks die eGFP-Expression durch den Verlust des Vektors bei der Zellteilung vollständig abhanden kommt oder die Expressionshöhe bis unter die Nachweisgrenze für FACS-Analysen abfallen kann (Nehlsen et al., 2006; Papapetrou et al., 2005). Außerdem wurde von Nehlsen (2004) gezeigt, dass die Expression eines auf einem pEpi-Vektor kodierten Transgens über die Konzentration der Selektionsdroge im Medium reguliert werden kann. Auch in dieser Arbeit wurden durch G418-Selektion Klongemische der Vektoren pEpi-FGSARF,

pEpi-FGM18F und pMARS-egfp generiert, in denen trotz Kultivierung unter Selektionsdruck nur ein Teil der Zellen eGFP exprimierten. Dieses Ergebnis deckt sich mit den an CHO-K1-Einzelklonen (Nehlsen, 2004) und MEL-Zellen (Erythroleukämiezelllinie der Maus; Papapetrou et al., 2005) gemachten Beobachtungen, wonach trotz Vorhandenseins des episomalen Vektors und Resistenz der Zellen gegenüber der Selektionsdroge G418 nur ein geringer Anteil der Zellen das Transgen exprimiert bzw. die Expression nur mit empfindlichen Nachweismethoden wie RT-PCR und Immunoblotting nachgewiesen werden konnte (Papapetrou et al., 2005). Eine Resistenz gegenüber G418 kann auch spontan auftreten, weshalb bereits desensitivierte Varianten der Neomycin-Phosphotransferase entwickelt wurden (Yenofsky et al., 1990).

Auf die mit *Minicircle*-DNA transfizierten Zellen wird kein Selektionsdruck ausgeübt, der *Minicircle* wird aber dennoch in einem Teil der Zellen dauerhaft transkribiert und somit auch repliziert. Es wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen anhand von *in vitro*- und *in vivo*-Ansätzen gezeigt, dass das Trennen von Expressionskassette und prokaryotischen Sequenzen die Transgenexpression steigert (Darquet et al., 1997 und 1999; Chen et al., 2003, 2004, 2007 und 2008 sowie Riu et al., 2005). Die Ursache für die transkriptionelle Inaktivierung von Transgenen in Plasmid-DNA hängt offenbar mit der kovalenten Verknüpfung von Expressionskassette und prokaryotischem Vektorrückgrat zusammen. Eine Methylierung der CpG-reichen, prokaryotischen DNA-Sequenzen und ein anschließendes Ausbreiten (*spreading*) über den Vektor kann zwar nicht ausgeschlossen werden, ist aber aufgrund des bisherigen Kenntnisstands als primäre Ursache des Expressionsrückgangs eher unwahrscheinlich. Dies gilt offenbar auch für den Vektor pEpi-eGFP. Papapetrou et al. (2005) zeigten, dass die Zugabe von 5'-Azacytidin, ein DNA-demethylierendes Agens, die Transgenexpression von pEpi-eGFP in MEL-Zellen nicht regeneriert.

Die epigenetische Inaktivierung von Plasmid-Vektoren scheint also nicht ausschließlich durch DNA-Methylierung verursacht. An methylierte DNA kann allerdings das Protein MeCP2 binden und so Histondeacetylasen rekrutieren (Nan et al., 1998). Sowohl Nehlsen et al. (2006) als auch Papapetrou et al. (2005) zeigten in ihren Untersuchungen an pEpi-Vektoren, dass die Expression durch Zugabe von Histondeacetylase-Inhibitoren gesteigert werden kann. Bakterielle Sequenzen eines Vektorrückgrats sind in eukaryotischen Zellen transkriptionell inaktiv, auch wenn die anschließende eukaryotische Expressionkassette aktiv ist. Die aktive Transkription spielt aber eine wichtige Rolle für den Erhalt des Histonacetylierungsmusters, da die Transkriptionsmaschinerie Histonacetyltransferase-Funktion besitzt (Utley et al., 1998). Die nicht transkribierten bakteriellen Vektoranteile könnten also eine dem Heterochromatin ähnliche Chromatinstruktur ausbilden, die die Expression des Transgens *in cis* negativ beeinflusst. Diese Annahme wurde 2007 von Riu et al. bestätigt. Durch ChIP (Chromatin-Immunopräzipitation)-Analysen von nicht replizierender Plasmid- und *Minicircle*-DNA nach *in vivo* Transfektion der Leber im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Plasmid-DNA vorwiegend Heterochromatin-ähnliche Histonmodifikationen aufweist, wohingegen der

Chromatinstatus der *Minicircle*-Vektoren dem transkriptionell aktiven Euchromatin entsprach. Chen et al. (2008) demonstrierten außerdem, dass die Reduktion der CpG-Motive im bakteriellen Plasmidrückgrat *in vivo* nicht zu einer Verringerung des Transgen-*silencing* führt. Das Abschirmen der bakteriellen Sequenzen des Plamids mit Isolator-Sequenzen (sogenannte *insulators* oder *boundary elements*) verringert dagegen das *silencing* der Expressionskassette, was mit der Vorstellung des *spreading* einer Heterochromatin-ähnlichen Struktur von den nichttranskribierten bakteriellen Sequenzen in die Expressionskassette übereinstimmt. Die Deletion des Plasmidrückgrats verhindert offenbar die Ausbildung Heterochromatin-ähnlicher Strukturen der transfizierten *Minicircle*-DNA und ermöglicht so die Transkription (und damit die Etablierung durch stabile Replikation), ohne dass Selektionsdruck notwendig wäre.

3.1.2 Der *Minicircle*-Vektor reduziert das Risiko der Insertionsmutagenese

Die zufällige Integration eines Vektors in das Wirtszellgenom kann zu einer Insertionsmutagenese mit kaum zu bewältigenden Folgen führen (Williams und Baum, 2003; Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Kaiser, 2003; Nam und Rabbitts, 2006). Der *Minicircle*-Vektor liegt sowohl in CHO-K1- als auch HEK293-Zellen episomal vor, wie die FISH-Analysen zeigten (Abbildung 2.4 und Nehlsen et al., 2006). Die Integration eines zirkulären Vektors ohne Selektionsmarker und entsprechendem Selektionsdruck auf die Wirtszelle erscheint relativ unwahrscheinlich. Durch Strangbrüche im *Minicircle*-Vektor als Folge der Gelaufreinigung der DNA kann es aber zur Kontamination mit linearisierten Vektor-Anteilen kommen, die zufällig in das zelluläre Genom integriert werden können. Im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen neigen CHO-K1-Zellen bevorzugt zur Integration zirkulärer DNA, beispielsweise bei der Calcium-Phosphat-Transfektion (Chen et al., 1987), was diese Zelllinie zu einem schwierigen Modell für episomal replizierende Vektoren macht. Laut Literatur ist auch insbesondere bei CHO-Zellen mit der Integration von mehreren Genkopien an einem Integrationsort zu rechnen (Chen et al., 1998). In der Southern Blot-Analyse von Klongemischen zeigen sich diese Tandemintegrationen durch eine dominante Bande in der erwarteten Größe des linearisierten Vektors, dagegen fallen Banden von Randfragmenten möglicherweise durch ihre zufällige Verteilung nicht auf. Wie die daher notwendige Analyse von CHO-K1-Klonen zeigte, finden zufällige Integrationsereignisse in das zelluläre Genom nach Transfektion der *Minicircle*-DNA statt (Abbildung 2.5). Ursache der häufigen Integrationsereignisse in diesen Klonen könnte auch die Vereinzelnung der Zellen im FACS bei der Herstellung der Klone und der damit verbundene Stress sein. Möglicherweise war hier auch die *Minicircle*-DNA-Präparation nicht gelungen, was die Notwendigkeit standardisierter *Minicircle*-DNA-Präparationen mit superhelikalem Status der DNA, wie sie von der PlasmidFactory GmbH, Bielefeld, zur Verfügung gestellt werden konnten, unterstreicht.

Zur Detektion ungewollter Integrationsereignisse sind Southern Blot-Analysen dennoch auch für Klongemische sinnvoll. Ein endgültiger Nachweis des episomalen Staus können aber bisher nur Metaphase-FISH-Experimente bringen. Die sogenannte Hirt-Extraktion zur Aufreinigung extrachromosomaler DNA ist für wenige Episomen-Kopien eher ungeeignet. Eine mögliche Alternative zu der laborintensiven FISH-Prozedur ist eine Southern Blot-Analyse der extrachromosomalen DNA nach gezieltem Verdau der genomischen DNA mit dem Enzym ATP-abhängigen DNase (Nehlsen, 2006; Maucksch, 2008). Das Enzym ATP-abhängige DNase besitzt eine doppelstrangspezifische Exonuclease- und eine einzelstrangspezifische Endonuclease-Aktivität. Es katalysiert unter ATP-Verbrauch die Hydrolyse von linearer doppelsträngiger DNA, und, mit geringerer Effizienz, auch von linearer und zirkulärer einzelsträngiger DNA. Linearisierung durch Restriktionsverdau und anschließender Abbau der genomischen DNA mit der ATP-abhängigen DNase beseitigt integrierte Vektorkopien. Im Southern Blot detektierte Banden resultieren dann ausschließlich aus episomal vorliegenden *Minicircle*-Molekülen und können mit dem Bandenmuster der isolierten Gesamt-DNA verglichen werden.

Die FISH-Analysen zeigten für den *Minicircle*-Vektor zufällig verteilte und mit den Metaphase-Chromosomen assoziierte, punktförmige Fluoreszenzsignale (Abbildung 2.4). Scherkräfte bei der Herstellung der Metaphase-*spreads* können zur Umverteilung der nur lose assoziierten Vektormoleküle führen, wie es auch von Stehle et al. für den pEpi-Vektor gezeigt wurde (2007). Bei fester Assoziation wäre eine symmetrische Anordnung zweier Signale an beiden Chromosomenarmen zu erwarten, wie es für den EBV-Virus demonstriert wurde (Kanda et al., 2007) und für pEpi nur in einigen FISH-Hybridisierungen gelang (Stehle et al., 2007). Wird der zirkuläre Vektor pEpi bzw. eines seiner Derivate unter Selektionsdruck mit G418 in CHO-K1-Zellen etabliert, kann es aber zu zufälligen Integrationen in das zelluläre Genom kommen, wie die intensiven Fluoreszenzsignale auf beiden Chromosomenarmen („*doublets*“) in den FISH-Analysen zeigten (Abbildung 2.4 sowie Nehlsen et al., 2006). Die zufällige Verteilung der *Minicircle*-Vektormoleküle macht dagegen deutlich, dass keine integrierte, sondern extrachromosomal vorliegende Vektor-DNA durch das FISH-Verfahren detektiert wird.

3.1.3 *Minicircle*-basierte CHO-K1-Zelllinien sind stabil

Die in dieser Arbeit gezeigte stabile Langzeitexpression der *Minicircle*-Vektoren in der biotechnologisch relevanten Zelllinie CHO-K1 (siehe 2.1.1 und 2.3.3) eröffnet auch die Möglichkeit der industriellen Nutzung dieses Vektortyps zur Herstellung von pharmazeutischen Proteinen, wobei die Zeit für die Selektion und die Screening-Prozedur zur Identifizierung von hochexprimierenden Zellklonen im Vergleich zu den üblichen Verfahren erheblich verkürzt werden könnte. Es wurde erwartet, dass episomale Expressionsvektoren keiner positionsabhängigen Expression unterliegen. Dennoch zeigen die mit *Minicircle*-DNA transfizierten Zellen

ein klonales Verhalten. Minicircle-CHO-K1-Klongemische weisen eGFP-Expressionslevel auf, die um mehr als zwei Größenordnungen variieren (Abbildung 2.7). Die Vektor-Kopienzahl liegt zwischen 4-10 Episomen pro Zelle (siehe 2.1.3), was zur Erklärung dieser Expressionsunterschiede nicht ausreicht. Die unterschiedlichen Expressionsniveaus deuten vielmehr auf feste Assoziations-*sites* der *Minicircle*-Moleküle in der Kernarchitektur hin. Die in dieser Arbeit untersuchten episomalen Klone L2 und M23 (siehe 2.2.1) behielten zudem ihr Expressionsniveau über den untersuchten Zeitraum von vier Monaten und auch bei Kryokonservierung (siehe 2.2.2) bei, was diese Annahme unterstützt.

Von Nehlsen (2004) wurde gezeigt, dass das Plasmid pEpi zur Herstellung von Antikörpern genutzt werden kann und die Expressionshöhe hierbei über den Selektionsdruck regulierbar ist. Neben der Gefahr der zufälligen Integration des Vektors ergaben sich mit steigender Plasmidgröße allerdings auch Schwierigkeiten bei der Kryokonservierung von CHO-K1-Klonen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass *Minicircle*-basierte CHO-K1-Klone ohne Verlust der Expression oder des episomalen Status kryokonserviert werden können (siehe 2.2.2). Die Größenreduktion des episomalen *Minicircle*-Vektors durch Entfernen der prokaryotischen Sequenzen und des Selektionsmarkers erhöht offenbar die Stabilität von *Minicircle*-basierten CHO-Zelllinien. Auch die Etablierung und Kultivierung ohne Selektionsdruck verringert das Risiko der zufälligen Integration von Vektorsequenzen und somit der Instabilität der generierten Produktionszelllinien (siehe 2.1.2 und 2.1.3).

Im Rahmen dieser Dissertation fanden außerdem erste Vorarbeiten zur Entwicklung eines regulierbaren Coexpressionssystems mit zwei parallel etablierten *Minicircle*-Vektoren zur Antikörperproduktion statt (Daten nicht gezeigt). Hierbei dienen Reportergene, die für fluoreszierende Proteine kodieren, als „*gene on duty*“ und übernehmen die notwendige Transkription in bzw. durch das S/MAR-Element. Das GOI (*gene of interest*), in diesem Fall die leichte bzw. schwere Kette eines humanen IgG-Antikörpers, befindet sich in einer zweiten Expressionskassette *upstream* dieser Einheiten. Diese Arbeiten werden nun in einer weiteren, industriegeförderten Doktorarbeit fortgesetzt (siehe auch 3.5.1). Die Voraussetzung zur biotechnologischen Nutzung des *Minicircle*-Vektors ist die in dieser Arbeit gezeigte Stabilität der CHO-K1-Klone.

3.2 SIDD-Profil können die Eigenschaften episomal replizierender, S/MAR-basierter Vektoren voraussagen

S/MAR-Elemente besitzen einen rekombinogenen Charakter (Bode et al., 2000a), wie auch die in dieser Arbeit spontan aufgetretene Größenreduktion der SAR E, vermutlich durch intramolekulare Rekombination, zeigt (siehe 2.2.3). Es ist ungeklärt, ob diese Deletion um 1,25 kb auf die Produktionsphase in Bakterien oder die fortgesetzte Kultur in CHO-Zellen zurückzuführen ist. Die Tatsache jedoch, dass

dieses größenreduzierte S/MAR-Element eine höhere Transgenexpression und episomale Stabilität vermittelt, ermöglicht es, die Faktoren, die für diese verbesserten Eigenschaften verantwortlich sein könnten, zu ermitteln. Dies geschah in der vorliegenden Arbeit durch Vergleiche von episomal replizierenden Vektoren mit der größenreduzierten S/MAR M18, der SAR E und einer artifiziellen Minimal-S/MAR, der Tetramer-S/MAR des Vektors pMARS (Abbildung 2.15; Jenke et al., 2004).

Vektoren, die auf der 733 bp großen S/MAR M18 basieren, zeigen eine geringere Tendenz zur zufälligen Integration in das zelluläre Genom und zu Sequenz-Rearrangements als die SAR E-basierten Vektoren oder auch pMARS (siehe 2.3.3.3 und 2.3.4). Diese verbesserte Stabilität beruht wahrscheinlich auf der geringeren Größe und damit verminderten Rekombinogenität des Vektors. Die repetitiven Elemente der ebenfalls nur 620 bp großen Tetramer-S/MAR des Vektors pMARS scheinen sich ebenfalls negativ auf die episomale Stabilität auszuwirken (siehe 2.3.4 sowie Bzymek et al., 2001).

S/MARs sind an der Organisation des Chromatins beteiligt und besitzen ein hohes Potential zur Strangtrennung (Bode et al., 1992). Diese Eigenschaft kann in SIDD-Profilen (*Stress-Induced Duplex Destabilization Profile*; Benham et al., 1997) dargestellt werden. Das SIDD-Profil berechnet die Stabilität der DNA-Doppelhelix und ermöglicht die Identifizierung jener Loci, die bei der Entstehung negativer Superhelizität, zum Beispiel durch eine voranschreitende Transkription, zur Strangtrennung neigen. Die Berechnung des Profils basiert aber nicht nur auf den Bindungsenthalpien einzelner Basenpaare, sondern bezieht auch den Einfluss benachbarter DNA-Sequenzen mit ein. Der Vergleich der SIDD-Profile für den *Minicircle*-Vektor SAR E und das zum Vergleich eingesetzte Plasmid pEpi-FGSARF zeigt, dass der *Minicircle* - mit Ausnahme der Transkriptionseinheit - über seine gesamte Sequenz destabilisiert ist, während das in pEpi-FGSARF vorhandene Vektorrückgrat in den meisten Bereichen stabil ist (Nehlsen et al., 2006). Diese fast durchgehende Destabilisierung des Vektors erleichtert den Zugriff durch die zelluläre Transkriptionsmaschinerie und wird in Kombination mit einer günstigen Assoziationsstelle an der Kernmatrix als Grund für die stabile Transkription und Replikation des *Minicircle*-Vektors gesehen.

Das in dieser Arbeit untersuchte 733 bp große S/MAR-Element M18 wirkt sich im SIDD-Profil des *Minicircles* M18 auch stark auf andere funktionelle Elemente des Vektors aus. Im Vergleich zum *Minicircle* mit SAR E zeigt sich im SIDD-Profil des *Minicircles* M18 eine deutlich stärkere Destabilisierung des SV40-Promotors (siehe 2.3.1.2). Von Götze et al. (2003) konnte eine Destabilisierung von Promotor und Terminator für die Gene des Interferon-Genclusters gezeigt werden. Auch Gene der Hefe oder rDNA-Gene von *Drosophila* oder der Maus weisen ein vergleichbares SIDD-Profil auf (Benham, 1996). Es handelt sich also offenbar um ein konserviertes Destabilisierungsmuster funktioneller Gene. Eine mögliche Erklärung ist, dass solche destabilisierten Promotorsequenzen die Transkriptionsinitiation fördern. Die stärkere Destabilisierung des SV40-Promotors im *Minicircle* M18 könnte also die

Ursache für die höhere Transgenexpression dieses Vektors sein. Die eGFP-Expression der Klongemische mit dem *Minicircle* M18 lag in den bisherigen Versuchen im Vergleich mit dem *Minicircle* SAR E etwa zwei bis fünf Mal so hoch (siehe 2.3.3.2).

Ein weiterer auffälliger Unterschied der SIDD-Profile der beiden Vektoren ist der deutlich stärkere Destabilisierungsspeak der SV40-Polyadenylierungsstelle 3' der S/MAR M18 (siehe 2.3.1.2). Die Northern Blot-Analysen der *Minicircle*- und pEpi-Vektoren mit der größenreduzierten S/MAR M18 zeigten eine vollständige Transkription der S/MAR mit Termination nach der SV40-Polyadenylierungsstelle, im Gegensatz zu den Vektoren mit SAR E, für die nur eine der drei Banden im Northern Blot mit einer vollständigen Transkription der SAR E vereinbar ist. Die Transkription scheint in den SAR E-Vektoren bevorzugt nach einem kryptischen Polyadenylierungssignal bei Basenpaar 450 in der S/MAR abzubrechen. Obwohl dieses polyA-Signal im S/MAR-Element M18 ebenfalls vorhanden ist, wird die Transkription bevorzugt an der SV40-Polyadenylierungsstelle 3' der S/MAR beendet. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen ist die stärkere Destabilisierung der SV40-polyA-Sequenz (Benham et al., 1996). Stark destabilisierte Sequenzen sind für die Transkriptionstermination notwendig, wie schon Zaret und Sherman 1982 an Experimenten in der Hefe zeigten. Die Deletion eines Teils des Terminatorbereichs im CYC-Gen führte zu einem Absinken der Terminationseffizienz für den 3'-Bereich auf etwa 10%. Auch Polyadenylierungssignale korrespondieren mit starken Peaks im SIDD-Profil, was von Mielke et al. (2002) am Beispiel des murinen alpha1-Collagen-Gens gezeigt wurde.

Die im Northern Blot gezeigte komplette Transkription der größenreduzierten S/MAR M18 im *Minicircle*-Vektor hat möglicherweise Einfluss auf die Expressionshöhe und Stabilität des Vektors. Der Vektor pEpi und auch der *Minicircle* werden nur episomal repliziert, wenn eine aktive Transkription des Gens *upstream* des S/MAR-Elements und auch eine partielle Transkription der S/MAR stattfindet (Stehle et al., 2003; Nehlsen, 2004). Das Ausmaß der Transkription durch das S/MAR scheint hierbei mit der Zahl etablierter Episomen in der Zelle zu korrelieren, wie die jüngsten Arbeiten der Gruppen um Athanassiadou und Antoniou (Sgourou et al., zur Veröffentlichung eingereicht) an S/MAR-basierten episomal replizierenden Plasmiden zeigten. Die Transkription einer gewebespezifischen Expressionskassette auf zwei unterschiedlichen Konstrukten vom pEpi-Typ in MEL-Zellen lief in einem Fall zu nur 30% durch das S/MAR. Für diesen Vektor wurde auch eine geringere Kopienzahl von 0,3 bis 1,8 pro Zelle festgestellt, im Gegensatz zu 2 bis 7 episomalen Kopien pro Zelle bei transkriptioneller Termination 3' der S/MAR für das andere Konstrukt. Die bisherigen Versuche lassen noch keine Rückschlüsse über die Zahl der etablierten Kopien des *Minicircles* M18 zu. Eine mögliche Ursache der höheren eGFP-Expression wäre also auch eine höhere Kopienzahl im Vergleich zum *Minicircle* SAR E als Resultat der kompletten Transkription der größenreduzierten S/MAR M18. Um die Stabilität der Transgen-mRNA trotz der notwendigen

Transkription durch die S/MAR zu verbessern, besteht die Möglichkeit, die primäre mRNA durch das Einfügen von *splice sites* von der S/MAR-Sequenz zu bereinigen. Eine Alternative ist das Anbringen einer Polyadenylierungsstelle 3' und einer Terminationsstelle 5' des S/MARs, wie es für das β -Globin-Gen demonstriert wurde (Sgourou et al., zur Veröffentlichung eingereicht).

Die Inkorporation von S/MAR-Sequenzen in episomale Vektoren kann weitreichende Auswirkungen auf andere funktionelle Vektorelemente haben. Kürzlich wurde gezeigt, dass ein S/MAR-Element in einem Plasmid, das auf dem EBV-Replikationsursprung und dem EBV *nuclear antigen-1* basiert, die Replikation des Vektors komplett verhindert (Giannakopoulos et al., 2009). Ursache war eine Konkurrenz des S/MAR-Elements mit dem destabilisierten EBV-Replikationsursprung, die im SIDD-Profil sichtbar wurde. Auch die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit der Sequenz-Analyse von S/MAR-basierten Vektoren mit Hilfe von SIDD-Profilen. Bei dem Design solcher Vektoren ist ein SIDD-Profil ein sinnvoller erster Schritt. Diese Beobachtungen ermöglichen aber auch die rationale Entwicklung starker S/MAR-Elemente von minimaler Größe für den zukünftigen Einsatz in episomal replizierenden Vektoren.

3.3 Ein industriell hergestellter, S/MAR-basierter *Minicircle* repliziert episomal

Die Vorteile, die *Minicircle*-Vektoren gegenüber herkömmlichen Plasmiden beispielsweise für gentherapeutische Ansätze bieten (Darquet et al., 1997 und 1999; Chen et al., 2003 und 2005; Nehlsen, 2006; Stenler et al., 2009), erklären die Notwendigkeit der industriellen Herstellung dieser Vektoren in großem Maßstab. Das stellt eine technische Herausforderung dar, und erst 2008 wurde ein im industriellen Maßstab durchführbares *Minicircle*-Produktionsverfahren publiziert (Mayrhofer et al., 2008; siehe auch 1.3.2 und 2.4). Durch die sogenannte RBPS (*recombination based plasmid separation*)-Technologie hergestellte DNA besteht zu knapp 99% aus *supercoiled Minicircle*-Monomeren. Die obigen Ausführungen über die Konkurrenz der Vektorelemente und ihres Strangtrennungspotentials miteinander (siehe 3.2) verdeutlichen die Notwendigkeit eines funktionellen Vergleiches des *Minicircle*-Vektors M18 mit dem industriell hergestellten *Minicircle* PF-M18, der zusätzliche Sequenzen (*LacO-tandem repeat* sowie eine *ParA*-Erkennungstelle) enthält, die möglicherweise die Transgenexpression oder episomale Stabilität beeinflussen könnten.

Die ersten Versuche zum Vergleich der Vektoren zeigten eine etwas niedrigere Etablierungsrate des Vektors PF-M18 bei einem höheren Anteil transienter Expressierer (siehe 2.4). Die SIDD-Analyse der Sequenz des Vektors PF-M18 weist eine etwas geringere Destabilisierung des SV40-Promotors im Vergleich zum *Minicircle* M18 auf (Daten nicht gezeigt). Der episomale Status des *Minicircle*-Vektors PF-M18 wurde im Southern Blot bestätigt. Auf der Grundlage dieser ersten

Resultate wird der *Minicircle* PF-M18 nun zur Generierung transgener Mäuse sowie transgener Kühe durch DNA-Injektion in den Zygoten-Vorkern bzw. das Zytoplasma eingesetzt (siehe 3.5.2 sowie Iqbal et al., zur Veröffentlichung eingereicht).

3.4 Histon-Hyperacetylierung verbessert die Etablierungsrate eines *Minicircle*-Vektors

Nach der Transfektion der *Minicircle*-DNA kann eine hohe transiente Transgenexpression in einem großen Anteil der Zellen beobachtet werden, die jedoch durch Verlust des Vektors in den folgenden Tagen abhanden kommt (siehe 2.4.1, 2.5.2 und 2.5.3 sowie Nehlsen et al., 2006). Die stabile Expression und Replikation des *Minicircles* wird höchstwahrscheinlich wie bei dem Plasmid pEpi über die Assoziation mit der Kernmatrix durch das Protein SAF-A vermittelt. SAF-A besitzt eine hohe Affinität zur S/MAR-Sequenz des Vektors (Jenke et al., 2002) und gehört zu den strukturgebenden Proteinen der Kernmatrix. Außerdem vermittelt SAF-A eine Histonacetyltransferase-Funktion und somit die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren (Martens et al., 2002; Roemig et al., 1992). In jüngeren Untersuchungen wurde gezeigt, dass etablierte pEpi-Moleküle bevorzugt mit offenem Chromatin assoziieren, das an den Lysinresten 9 und 14 des Histons H3 acetyliert ist (Stehle et al., 2007). Möglicherweise wird die stabile Expression des *Minicircle*-Vektors in einem gewissen Anteil der Zellen durch besonders günstige Assoziationsstellen an der Kernmatrix im Bereich aktiven Chromatins vermittelt, was der zellulären Transkriptions- bzw. Replikationsmaschinerie den Zugang zur Vektor-DNA ermöglicht. Um diese Annahme zu überprüfen und den Etablierungsmechanismus der episomal replizierenden Vektoren näher zu charakterisieren, sollte die Transfektion der *Minicircle*-DNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus sowie von Butyrat-behandelten Zellen stattfinden, und die Auswirkung auf die transiente Expression sowie die Etablierung der *Minicircle*-Vektoren untersucht werden (siehe 2.5). Eine Erhöhung des Anteils transient exprimierender Zellen ist zum Beispiel im Hinblick auf die biotechnologische Nutzung der Vektoren zur Proteinproduktion relevant – der vorliegende episomal replizierende *Minicircle*-Vektor vereint die Vorteile eines transienten und eines stabilen Expressionssystems.

Der Zusatz der kurzkettigen Fettsäure Natrium-Butyrat zum Zellkulturmedium bewirkt eine nichtkompetitive und reversible Hemmung von Histondeacetylasen (HDACs) und dadurch eine Hyperacetylierung von Histonproteinen (Sealy & Chalkley, 1978; Schlake et al., 1994). Diese Wirkung ähnelt der des spezifischen Histondeacetylase-Hemmers Trichostatin A (TSA), einem Fungizid, das keine strukturelle Ähnlichkeit mit Butyrat aufweist (Yoshida et al., 1990). Der Grad der Histonacetylierung beeinflusst die Kondensation des Chromatins und damit seine Transkriptionsfähigkeit. Das transkriptionell aktive und nur schwach kondensierte Euchromatin weist eine Hyperacetylierung der Lysinreste nahe am N-Terminus der

Histone H3 und H4 auf, was deren positive Ladung neutralisiert und so die Affinität zur negativ geladenen DNA senkt (Bode et al., 1986; Wolffe & Pruss, 1996). So führt auch die Butyrat-vermittelte Histon-Hyperacetylierung zu einer Auflockerung des Chromatins und einer gesteigerten Transkriptionsaktivität.

Histonacetylase-Inhibitoren kehrten in den letzten Jahren in das Interesse der Forschung zurück, nachdem ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Histonacetylierung und Krebsentstehung gezeigt wurde (Archer et al., 1999). Der Einsatz von HDAC-Inhibitoren wurde daher in der Krebstherapie erprobt (Überblick in Kouraklis et al., 2006). Butyrat wirkt auf verschiedene Krebszellen antiproliferativ und induziert den programmierten Zelltod, die Apoptose (Hague et al., 1995; Ruemmele et al., 1999). Die Inkubation verschiedener Zellen mit Butyrat verursacht einen Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase. Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, Butyrat verändert offenbar das Expressionsmuster von Proteinen der Zellzykluskontrolle wie Zyklinen und Zyklin-abhängigen Kinasen (Siavoshian et al., 1997) und Faktoren wie p53 und p21Waf1/Cip1 bzw. p27kip1 (Palmer et al. 1997; Archer et al. 1998).

Um unterscheiden zu können, ob Butyrat die Expression und Etablierung des *Minicircles* durch Histon-Hyperacetylierung oder durch die Synchronisation der Zellen beeinflusst, wurde mit der Methode des *confluence blocks* ein schonendes, alternatives Synchronisationsprinzip gewählt. Hierbei wird durch Wachstum der Zellen in der Kulturschale bis zur maximalen Konfluenz ein Arrest in der G0/G1-Phase des Zellzyklus induziert (Davis et al., 2001; Grosjean et al., 2002). CHO-Zellen lassen sich außerdem effektiv mit L-Mimosin in der frühen G1-Phase blocken (Grosjean et al., 2002). Die Aminosäure L-Mimosin stammt aus der Mimose (*Leucaena leucephala*) und ist ein Eisen-Chelator. Da diese Eisen-Depletion DNA-Strangbrüche verursachen kann (Szüts et al., 2004) und so den episomalen Status des *Minicircle*-Vektors gefährden könnte, wurde diese Synchronisationsmethode nicht eingesetzt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten für die mittels *confluence block* synchronisierten Zellen einen erhöhten Anteil transient eGFP-exprimierender Zellen bei Transfektion in der späten S-Phase (siehe 2.5.2). Auch Marenzi et al. (1999) zeigten in einer Mausfibroblastenzelllinie eine Abhängigkeit der Transgenexpression von der Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der Lipofektion. Der Unterschied lag hier nicht in einer unterschiedlichen Transfektionseffizienz, sondern viel mehr im epigenetischen Zustand der transfizierten Plasmid-DNA begründet. Bei Transfektion in der G0-Phase wurde die eingebrachte DNA Heterochromatin-ähnlich verpackt, wohingegen sich bei Lipofektion in der S-Phase die transfizierte DNA als weitaus empfindlicher gegen die Mikrokokken-Nuklease erwies, also eher Euchromatin-ähnliche Strukturen besaß.

Die Etablierungsrate des *Minicircles* in den durch *confluence block* synchronisierten Zellen, also der Anteil stabiler eGFP-Expriemer, entsprach in den hier durchgeführten Versuchen etwa dem Wert der asynchronen Kontrolle. Die Zell-

zyklusphase zum Zeitpunkt der Transfektion scheint also keinen großen Einfluss auszuüben (siehe 2.5.3).

Die Behandlung der Zellen mit Butyrat erhöhte den Anteil transienter Exprimierer im Mittel nur leicht, der Anteil stabil eGFP exprimierender Zellen konnte allerdings von 1,8% bis 3% ohne Butyrat-Behandlung auf 2,9% bis 4% in einmal mittels FACS sortierten Zellen gesteigert werden (siehe 2.5.3). Die Histon-Hyperacetylierung und die damit verbundenen strukturellen Änderungen im Chromatin scheinen folglich einen positiven Einfluss auf die Etablierung des *Minicircles* auszuüben. Für pEpi wurde gezeigt, dass dieser Vektor einmal in der frühen S-Phase des Zellzyklus repliziert wird (Schaarschmidt et al., 2004). Die Histon-Hyperacetylierung verursacht in den Zellen eine Verkürzung der S-Phase (siehe auch 2.5.1), vermutlich durch die frühere Replikation von sonst später in der S-Phase replizierten Genen, wie es beispielsweise für den β -Globin-Lokus in HeLa-Zellen gezeigt wurde (Kemp et al., 2005). Die erhöhte Replikationsaktivität des hyperacetylierten Chromatins in der frühen S-Phase verbessert womöglich auch die Replikation des *Minicircle*-Vektors. Histon-Hyperacetylierung führt zu einer generellen Auflockerung des Interphase-Chromatins inklusive der heterochromatisierten Bereiche (Tóth et al., 2004). Eine weitere Ursache dürfte daher die Öffnung von günstigen Assoziationsstellen mit der Kernmatrix für die eingebrachte DNA sein.

3.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung der notwendigen Elemente und des Etablierungsmechanismus' eines neuartigen, S/MAR-basierten *Minicircle*-Vektors. Ein sicherer, nicht-viraler, episomal replizierender und stabil exprimierender *Minicircle*-Vektor bietet Einsatzmöglichkeiten in der somatischen Gentherapie sowie in der Herstellung transgener Tiere, aber auch in der Produktion von pharmazeutisch relevanten Proteinen. Einige dieser Projekte, zu denen bereits Vorstudien durchgeführt werden, sollen an dieser Stelle kurz vorgestellt werden.

3.5.1 *Minicircles* für die industrielle Herstellung von rekombinanten Proteintherapeutika

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die episodale Stabilität und Langzeitexpression von *Minicircle*-basierten CHO-K1-Klonen, auch nach Kryokonservierung, gezeigt. Zur Herstellung eines humanen IgG-Antikörpers in CHO-K1-Zellen wird zurzeit in einer weiteren, industriegeförderten Doktorarbeit ein flexibles Coexpressionssystem mit zwei simultan oder sequentiell transfizierten *Minicircle*-Vektoren, die für die leichte bzw. schwere Kette kodieren, etabliert. Dieses System vereint dabei die Vorteile transienter und stabiler Expressionssysteme. Durch die Kombination des GOI mit einem Fluoreszenzmarker,

möglicherweise über einen bidirektionalen Promotor, lassen sich hochexprimierende Klone selektieren. So lässt sich auch durch Sortierung per FACS das optimale Mengenverhältnis der leichten und schweren Antikörperkette einstellen (siehe auch 3.1.3). Alternativ kann auch der Anteil Zellmembran-gebundener sekretorischer Proteine als Maß der Expressionshöhe und zur Selektion von Hochexprimierern eingesetzt werden (Brezinsky et al., 2003). So wird nicht nur die Expressionshöhe, sondern auch die Sekretionsleistung der Klone erfasst. Ziel ist die Etablierung dieses Co-Expressionssystems in verschiedenen CHO-Zelllinien im Labormaßstab und schließlich ein *proof of concept* unter industriellen Bedingungen.

3.5.2 Generierung transgener Tiere

Genetisch modifizierte Tiere dienen der Grundlagenforschung, sind aber auch ein wichtiges Modellsystem für die Gentherapie. Die gängige Methode zur Herstellung transgener Tiere ist die Injektion der linearen DNA in den Pronukleus befruchteter Eizellen, den Zygoten-Vorkern. Im Jahre 2006 wurde von Manzini et al. die Herstellung transgener Schweine mit dem episomal replizierenden Vektor pEpi durch die Methode des sogenannten Spermien-vermittelten Gentransfers (Lavitrano et al., 1989) veröffentlicht. Ein neuer, alternativer Ansatz ist die Injektion von *supercoiled* DNA in das Zytoplasma von Zygoten (Iqbal et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Der *Minicircle*, zunächst der *Minicircle* SAR E, inzwischen auch der weiterentwickelte und industriell hergestellte PF-M18, wurde hierfür in Kooperation mit dem Institut für Tierzucht (Mariensee, Neustadt) eingesetzt und mit dem Plasmid pEpi, einem S/MAR-freien Plasmid sowie einem BAC (*bacterial artificial chromosome*) verglichen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf den episomalen Status sowie DNA-Methylierungsanalysen der eingesetzten DNA gelegt. Die Ergebnisse, ob die replikationskompetenten, S/MAR-basierten Vektoren die Herstellung transgener Tiere mit dieser Methode ermöglichen, stehen noch aus.

In Zusammenarbeit mit dem Ruakura Research Centre in Hamilton, Neuseeland, soll die Möglichkeit erprobt werden, mit einem *Minicircle*-Vektor transgene Kühe zu generieren. Der Vektor trägt das GOI unter der Kontrolle des β -Casein-Promotors und ermöglicht es so, pharmazeutisch relevante Proteine in der Milch zu produzieren.

3.5.3 Episomal replizierende 1- und 2-LTR-Circles als neuartige Vehikel in der Gentherapie

Die in dieser Arbeit durch ein Deletionsereignis entstandene und charakterisierte, Größenreduzierte S/MAR M18 ermöglicht die Entwicklung von replizierenden, S/MAR-basierten 1- und 2-LTR-circles.

1- bzw. 2-LTR-*circles* entstehen als Intermediat bei der retroviralen Infektion von Zellen. Integriert diese DNA nicht, geht sie bei der Teilung der Wirtszelle verloren. In ersten Vorstudien wurden zunächst herkömmlich hergestellte *Minicircles* mit dem S/MAR M18 und zusätzlichen LTR-Sequenzen durch Lipofektion in verschiedene Zelllinien transfiziert und die Transgenexpression sowie der episomale Status auch in Zellklonen überprüft (Oumard, unveröffentlicht). Durch sogenannte Pseudotransduktion mit integriresdefekten Lentiviren sollen schließlich replikationskompetente, S/MAR-basierte 1- und 2-LTR-*circles* in die Zellen eingebracht werden. Dieses Verfahren ermöglicht auch die Modifikation schwierig zu transfizierender Zellen und könnte über die Ansteuerung günstiger Assoziations-*sites* in der Kernarchitektur durch die integriresdefekten Lentiviren die Etablierungsrate der episomal replizierenden Vektoren steigern.

4. Material und Methoden

4.1 Geräte

Tischzentrifugen	Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge pico Eppendorf Centrifuge 5417 C Hettich Rontanta/S
Kühlzentrifugen	Sorvall RC 5 Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge fresco
Vakuumzentrifuge (Speedvac)	Savant Instruments Inc. mit Ölschieber- Vakuumpumpe und Kühlfalle Eppendorf, Concentrator 530
Rotoren	SS34 GSA
(Spektral)Photometer	Eppendorf Biophotometer 6131 NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
Gelelektrophoresekammer	BRL Horizon 58 BRL Horizon 1114 BRL Horizon 2025
Mikroskop	Olympus CK 2, Leitz Labovert, Zeiss Axiovert TV 135 mit Fluoreszenzvorrichtung
UV-Kammer	Hanau
Phosphoimager	Molecular Dynamics
Netzgeräte	Biorad Power Pac 300
Durchflussszytometer	FACScan von Becton Dickinson FACSCalibur von Becton Dickinson FACSAria von Becton Dickinson Macintosh Quadra 650
Zellzähler	Schärfe System Casy 1
Zellkultur-Inkubatoren	Forma Scientific Water-jacked Incubator Modell 3336
Cleanbenches	Mecaplex, Sterilcard Hood VBM600 und SG400 Heraeus, HLB 2448 Heraeus, HSP 18
pH-Meter	M 340, Beckmann
PCR-Maschine	Biometra T3 Thermocycler
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer 5436
Vortex	Scientific Industries Vortex Genie 2
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore Milli-Q
Hybridisierungsöfen	Stuart Scientific Hybridization Incubator

4.2 Materialien

4.2.1 Filterpapiere und Transferfolien

Sterilfiltration	Sartorius Membranfilter, Porengröße 0,45 µm und 0,22 µm, d = 47 mm
Nylonmembran	Amershan Pharmacia Biotech Hybond-XL
DEAE-Papier	Whatman 3MM

4.2.2 Autoradiographie

Expositionskammer Molecular Dynamics Expositionskassetten für den Phosphoimager

4.2.3 Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen Abbott Molecular Inc., Amersham, Bayer, Biolabs, Boehringer, Difco, Flow, Fluka, Gibco, Hoechst, Invitek, Macherey-Nagel, Merck, Peqlab, Pharmacia, Promega, Qiagen, Serva, Sigma, Stratagene und USB verwendet. Radiochemikalien wurden von Amersham-Buchler und Hartmann bezogen. Die Enzyme lieferten Biolabs, Biozym Scientific GmbH und Roche Pharma. Oligonukleotidsynthesen wurden von der Firma MWG durchgeführt.

4.2.4 Zellkulturmaterialien

Das Plastik-Zellkulturmaterial für die eukaryontischen Zellen wurde von den Firmen Costar, Gibco, Greiner, Nunc und Seromed bezogen.

4.2.5 Computerprogramme

Die Texte, Grafiken und Tabellen in dieser Arbeit wurden mit den Programmen Word, Powerpoint, Excel der Firma Microsoft sowie dem Programm CorelDraw11 erstellt. Die Bearbeitung von Bilddateien erfolgte mit dem Programm Photoshop 5.0 der Firma Adobe. Zur Entwicklung von Klonierungsschritten, zum Auffinden von PCR-Primer-Sequenzen und zur Restriktionskartierung wurde Vektor NTI 6.0 von

ATCC verwendet. Die Auswertung von Autoradiographien erfolgte mit Image Quant Version 5.0 von Molecular Dynamics. Die Auswertung von FACS-Analysen erfolgte mit CellQuest Pro und ModFit LT.

Die Suche nach Polyadenylierungssignalen erfolgte mit polyadq (Tabaska et al., 1999; http://rulai.cshl.org/tools/polyadq/polyadq_form.html).

SIDD-Profile wurden erstellt mit webSIDD (Benham et al., 2004; <http://genomics.ucdavis.edu/benham/sidd/index.php>).

4.3 Allgemeine Grundtechniken

(nach Sambrook et al., 1989)

4.3.1 Sterilisieren

Glasgeräte werden vor Gebrauch 4 Stunden bei 180° C hitzesterilisiert. Alle Lösungen werden sterilfiltriert (0,22 µm Filter) oder autoklaviert (20 Minuten, 121°C, 1 bar).

4.3.2 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung versetzt man 1 Volumen wässriger DNA-Lösung mit 2 Volumen 0,6 M LiCl in Ethanol, fällt für 10 Minuten bei 4°C und zentrifugiert anschließend 30 Minuten mit 13000 rpm bei 4°C. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und im Vakuum oder bei 37°C getrocknet. Neben Ethanol kann auch Isopropanol zur DNA-Fällung benutzt werden, wobei das 0,6fache Volumen der DNA-Lösung eingesetzt wird.

4.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

4.3.3.1 Photometrische Bestimmung

Die Extinktion der Nukleinsäure wird photometrisch bei 260 nm zum Beispiel im NanoDrop-1000 bestimmt. Das Verhältnis der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Extinktionen sollte für eine sorgfältig präparierte und proteinfreie Nukleinsäure zwischen 1,8 (DNA) und 2,0 (RNA) liegen.

4.3.3.2 Elektrophoretische Bestimmung

Geringe Nukleinsäuremengen lassen sich auch durch Elektrophorese eines Aliquots abschätzen. Die Fluoreszenzintensität der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ist ihrer Menge direkt proportional. Daher kann durch visuellen Vergleich der unbekannten Probe mit einer DNA bekannter Konzentration die unbekannte Menge abgeschätzt werden. Zusätzlich wurde der MassRuler™ DNA Ladder, High Range, der Firma Fermentas verwendet (#SM0393).

4.4 Arbeiten mit *E. coli*

4.4.1 Verwendete *E. coli*-Stämme

DH10B: [F' mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 ara Δ 139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ - rpsL end A1 nupG λ - tonA]; (Gibco BRL)

XL1-Blue: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB, lacIqZ) M15, Tn10, (Tetr)], (Bullock, 1987)

Top10F': F'{lacIq Tn10 (Tetr)}, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG; (Firma Invitrogen)

MM294-Flp: [F- λ - supE44 endA1 thi-1 hsdR17 lacZ::cl857-FLP], basiert auf MM294 (Buchholz et al., 1996a, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stewart, A.F., TU Dresden)

4.4.2 Kulturmedien für Bakterien

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, autoklavieren.

TB-Medium: 12 g Bacto-Trypton, 24 g Bacto-Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, ad 900 ml, autoklavieren; vor Gebrauch werden 100 ml steriles 17 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄ zugesetzt.

4.4.3 Herstellung von Agarplatten

Dem LB-Medium werden 15 g Agar pro Liter zugegeben. Zur Herstellung Ampicillin-haltiger Agarplatten wird 1/1000 Volumen Ampicillin einer sterilfiltrierten

Stammlösung (50 mg/ml in Ethanol) beigemischt. Zur Herstellung Kanamycin-haltiger Agarplatten wird 1/2000 Volumen Kanamycin einer sterilfiltrierten Stammlösung (100 mg/ml in H₂O) zugegeben.

4.4.4 Herstellung elektrokompenter Bakterien

1 l LB-Medium wird mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft. Man lässt die Zellen bei 37°C unter starkem Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 wachsen und zentrifugiert sie anschließend 10 Minuten in einem vorgekühlten GS3-Rotor bei 3000 rpm ab. Das Zellpellet wird nun in 1 l kaltem Wasser resuspendiert und wie beim ersten Mal zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 500 ml kaltem Wasser aufgenommen und wiederum wie oben zentrifugiert. Nun wird das Pellet in 20 ml kaltem 10 %-igen Glycerin resuspendiert, wie beschrieben zentrifugiert und schließlich in einem Endvolumen von 2-3 ml 10 %-igem Glycerin resuspendiert. Die so aufgenommenen Zellen werden in 50 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

4.4.5 Elektrotransformation von *E. coli*

Bei der Elektrotransformation wird ein Gemisch aus DNA und kompetenten Zellen einem exponentiell abfallenden elektrischen Feld mit sehr hoher Ausgangsamplitude ausgesetzt. Die Transformationseffizienz liegt je nach Qualität der elektrokompenten Bakterien bei 10⁹-10¹⁰ Transformanten/µg DNA. Ein 50 µl-Aliquot der kompetenten Zellen wird bei Raumtemperatur aufgetaut und auf Eis gestellt. 1 µl einer Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes wird hinzugegeben, gut gemischt, und der Ansatz in eine sterile, vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette pipettiert. Anschließend wird die Küvette in der Elektrotransformationskammer einem elektrischen Feld ausgesetzt. Pulse Controller und Gene Pulser werden auf 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω eingestellt. Die Zeitkonstante, die am Gerät überprüft werden kann, sollte zwischen 4 und 5 ms betragen, die elektrische Feldstärke beträgt dann 12,5 kV/cm. Danach werden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Kapsenbergröhrchen überführt und bei 37°C 20 bis 30 Minuten geschüttelt. Anschließend werden unterschiedliche Mengen des Transformationsansatzes auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert. Man lässt die Klone über Nacht bei 37°C heranwachsen und kann sie dann durch eine „Mini“-Plasmidpräparation charakterisieren.

4.4.6 Konservieren von Bakterienkolonien

Zur kurzfristigen Lagerung werden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, bei 37 °C über Nacht inkubiert und im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt. Eine langfristige Lagerung ist durch Vermischen einer 5 ml Übernacht-Kultur mit 87 % Glycerin im Verhältnis 1:1 und Aufbewahren bei –20 °C oder –70 °C möglich.

4.5 Isolierung von Nukleinsäuren

4.5.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab mit der „Boiling Prep“-Methode

(nach Dan Cimbora, FHCR, Seattle)

Diese Methode eignet sich zur DNA-Isolierung für alle *E.coli*-Laborstämme (DH5A, DH10B, XL1Blue). Vorteile liegen in der schnellen Durchführung (etwa 30 min) und in der hohen Qualität der DNA (basiert auf „Boiling Prep“ nach Holmes und Quigley).

STET:	<u>für 500 ml</u>
8 % Sucrose	40 g
0,5 % Triton	12,5 ml Triton 20 %
50 mM EDTA	50 ml 0,5 M EDTA
10 mM Tris (pH8)	5 ml 1 M Tris/HCl
H ₂ O	
LTE:	10 mg Lysozym / 1 ml TE
7,5 M NH ₄ Ac	
TER:	10 µg RNase A / 1 ml TE
autoklavierte Zahnstocher	

Eine *E.coli*-2 ml LB/TB-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum wird für 4 bis 16 h bei 37 °C geschüttelt. Nach Umfüllen in 2,2 ml-Eppendorfgefäße werden die Proben für 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Pellets werden in je 500 µl STET-Puffer suspendiert und mit 50 µl LTE (10 mg/ml, bei –20 °C lagern) versetzt. Nach einer Inkubation von 2-3 min bei RT werden die Proben 90 Sekunden in einem Eppendorf Thermomixer bei 95 °C inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation (14000 UpM) bildet sich ein zähflüssiges Pellet, das mit einem Zahnstocher entfernt wird. Es werden 50 µl 7,5 M NH₄Ac und 500 µl Isopropanol zugefügt, gevortext und die DNA für 5 min bei 14000 rpm pelletiert. Nach einem kurzem Trocknen wird das Pellet in 100 µl TER-Lösung (RNase A 10 µg/ml) aufgenommen. Es werden 5 µl zur Restriktionsanalyse eingesetzt.

4.5.2 "Midi"-Plasmidpräparation (Qiagen)

Puffer P1 (Resuspensionspuffer):	50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysispuffer):	200 mM NaOH, 1 % SDS
Puffer P3 (Renaturierungspuffer):	3,0 M NH ₄ OAc
Puffer QBT (Äquilibrierungspuffer):	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % Ethanol, 0,15 % Triton X-100
Puffer QC (Waschpuffer):	1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % Ethanol
Puffer QF (Elutionspuffer):	1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 15 % Ethanol

Die zu präparierenden Bakterienklone werden in 200 ml LB-Medium in einer Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (10 Minuten, 5000 rpm) werden die Kulturen nach den Angaben des Herstellers Qiagen aufgearbeitet. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt bei dieser Methode durch die Bindung der DNA an eine Anionenaustauscher-Säule basierend auf SiO₂. Nach dem Entfernen von Verunreinigungen durch Waschschriffe wird die DNA mit einem Hochsalzpuffer von der Säule eluiert, mit Isopropanol präzipitiert und mit 70 % Ethanol entsalzt.

4.5.3 DNA-Rückgewinnung aus Gelen mit dem 'QIAquick' Gel Extraktions Kit

Das Prinzip der Extraktion beruht auf der DNA-Bindung an eine Silica-Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffern, während Verunreinigungen aus der Säule ausgewaschen werden. Anschließend wird die DNA mit TE oder H₂O eluiert. Die zu isolierende Bande wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen über eine Säule gereinigt.

4.5.4 Isolierung von hochmolekularer DNA aus Säugerzellen: Quick-DNA (nach Ramirez-Solis et al., 1995)

"Modified Bradleys": 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5 % SDS, 1 mg/ml Proteinase K

Konfluent gewachsene Zellen einer 9,1 cm² Kulturplatte werden mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml der Proteinase K-Lösung versetzt. Nach Überführen der Lösung in 1,5 ml Eppendorfgefäße inkubiert man über Nacht bei 55°C. Anschließend wird die DNA durch vorsichtige Zugabe von 100 % Ethanol mit 75 mM NaAc ohne Schütteln 2-3 Stunden bei Raumtemperatur präzipitiert. Durch

vorsichtiges Schwenken und einem anschließenden Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 5000 rpm wird die DNA pelletiert. Danach erfolgen zwei Waschschriffe, bei denen das DNA-Pellet mit 0,5 ml 70 % Ethanol für 30 Minuten stehengelassen und anschließend wie beim ersten Mal abzentrifugiert wird. Nach dem zweiten Waschschriff lässt man das DNA-Pellet für 10 Minuten bei Raumtemperatur trocknen und nimmt die DNA dann in 30 µl TE auf, so dass die DNA-Konzentration ca. 0,5 µg/µl beträgt. Die so erhaltene HMW-DNA kann direkt für den Restriktionsansatz und anschließende Southern Blot-Analysen eingesetzt werden, es empfiehlt sich der Einsatz von 8 µl DNA.

4.5.5 RNA-Isolierung

Etwa 1×10^6 Zellen werden mit PBS gewaschen und mit TEP geerntet. Nach einer Zentrifugation (5 Minuten, 1000 rpm) kann das Pellet bei -70°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

4.5.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit

Gesamt-RNA aus Zellen wird mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Dieses System basiert auf den selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran, an welche bis zu 100 µg RNA mit einer Länge von über 200 bp gebunden werden können. Hierzu werden bis zu 1×10^7 Zellen geerntet, in 350 µl oder 700 µl Mercaptoethanol-haltigem RLT-Puffer homogenisiert und mit 350 µl bzw. 700 µl 70% EtOH gemischt. Dieses Gemisch wird auf die RNeasy Säule gegeben, an der die Gesamt-RNA bindet. Nach einer Zentrifugation von 15 sec bei 10.000 rpm werden Verunreinigungen durch die Applikation von Waschpuffern entfernt. DNA-Kontaminationen werden durch DNaseI beseitigt. Die Elution der RNA erfolgt in 30-50 µl H₂O. Die isolierte RNA wird bei -70°C gelagert.

4.5.5.2 Isolierung von polyA⁺ RNA mit dem Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit

Die polyadenylierte mRNA wird mit dem Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit nach Anweisung des Herstellers isoliert. Das Prinzip beruht auf der Bindung des polyadenylierten 3'-Ende der mRNA an einer kovalent an magnetischen Partikeln gebundenen Oligo-d(T)-DNA-Sequenz. Nach Durchmischung der Dynabeads mit dem Zell-Lysat in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen werden diese für 3-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die an die magnetischen Partikel gebundene polyA⁺ RNA mit einem Magnethalter der Firma Dynal (MCP-M) aus der Suspension separiert. Der Überstand wird verworfen. Es folgen mehrere

Waschschritte. Nach dem letzten Waschschritt wurde die gebundene polyA⁺ RNA mit 20 µl Elutionspuffer eluiert. Die isolierte RNA wird bei -70°C gelagert.

4.6 DNA-Modifizierung

4.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die DNA in einer Konzentration von bis zu 1 µg/µl wird in dem vom Hersteller angegebenen Puffer bei der angegebenen Temperatur (zumeist 37°C) gespalten. Zur Spaltung von Plasmid-DNA wird die 1-4-fache Menge an Enzymeinheiten (*units*) eingesetzt. Die Zugabe des Enzyms sollte 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da sonst Sternaktivitäten auftreten können. Die gespaltenen Fragmente können anschließend für Klonierungen, Transfektionen oder radioaktive Markierungen eingesetzt werden.

4.6.2 Auffüllen von 5'-überstehenden Enden

10x Klenow-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 2 mM DTT

dNTP-Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 3 mM in Wasser

Für Klonierungszwecke kann es notwendig werden, die durch die Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme entstandenen 5' kohäsiven Enden mit 'Klenow'-Enzym aufzufüllen um glatte Enden zu erzeugen. Zudem wird diese Klenow-Auffüllreaktion zur radioaktiven Markierung von Plasmid-DNA verwendet. In einem Reaktionsansatz von 30 µl werden bis zu 1 µg gespaltene DNA mit 4 µl Nukleotid-Mix und 1-2 U des Klenow-Enzyms in 1x Klenow-Puffer bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wird durch Phenol-Extraktion gestoppt und die DNA durch Fällung gereinigt.

4.6.3 Dephosphorylierung

10x Phosphatasepuffer: 500 mM Tris/HCl, pH 9, 10 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 1 mM Spermidin

Um bei einer Ligation die Religation des Vektors zu verhindern, werden überstehende 5'- oder 3'-Enden der DNA-Fragmente mit alkalischer Phosphatase (*calf intestine phosphatase*, CIP) dephosphoryliert. Dazu werden in einem Reaktionsansatz von 100 µl Endvolumen 10 µl 10x Phosphatasepuffer und 20-100

pmol überstehende Enden mit 1-2 U Phosphatase für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 U Enzym wird für weitere 30 min inkubiert und die Reaktion anschließend durch Hitzeinaktivierung gestoppt.

4.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten zur Transformation

5x Ligasepuffer : 250 mM Tris/HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 25% (w/v) PEG 8000, 5 mM ATP, 5 mM DTT

Bei der Ligation verknüpft die T4-DNA-Ligase DNA-Fragmente, die sowohl kompatible überstehende als auch glatte Enden besitzen können. Dabei erfolgt eine Phosphodiester- Bindung zwischen den 3'-OH- und den 5' Phosphatenden der DNA. Ca. 20 fmol gespaltenen und u.U. dephosphorylierter Vektor wird mit ca. 60 fmol Insert in 20 µl mit 4 µl 5x Ligasepuffer und 2 U T4-DNA-Ligase für mindestens 4 Stunden oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Für Klonierungen mit Oligonukleotiden werden 300 pmol beider Oligos zunächst in 10 µl Wasser gemischt. Der Ansatz wird bei 70°C 5 Minuten denaturiert, dann wird langsam auf 35°C im Thermomixer abgekühlt. Zwischendurch erfolgen einige kurze Zentrifugationen. Die Ligation erfolgt unter Verwendung des gesamten Ansatzes mit gespaltenem Vektor wie beschrieben.

4.7 Charakterisierung von Nukleinsäuren

4.7.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

(Saiki et al., 1988; Anwendungsbeispiele: Innis et al., 1990)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine einfache, aber effiziente Methode zur Vermehrung eines bestimmten DNA-Segments *in vitro* aus einem Gemisch unterschiedlichster DNA-Sequenzen (z.B. Plasmide, genomische DNA, cDNA-Präparationen). Dazu muss lediglich die Sequenz der Grenzen des Segments zum Design geeigneter Oligonukleotidprimer bekannt sein. Diese werden anschließend durch eine DNA-Polymerase bei einer intermediären Temperatur verlängert. Die Verwendung von thermostabilen Polymerasen erlaubt die häufige Wiederholung dieses Zyklus ohne erneute Zugabe des Enzyms. In den meisten Fällen verwendet man die sogenannte Taq-Polymerase von *Thermophilus aquaticus*. Es gibt allerdings noch eine Reihe anderer möglicher Enzyme, die bei speziellen Anforderungen zum Einsatz kommen. So verwendet man zusätzlich Polymerasen mit *proof reading*-Aktivität, wenn die Fehlerquote in der Sequenz des Amplifikats sehr niedrig sein soll. Ein solches Korrekturleseenzym überprüft die von der Taq-

Polymerase synthetisierten Sequenzen und verbessert eingebaute Fehler, was die Fehlerhäufigkeit auf 1/10 verringert. Mit einem solchen System können PCR-Produkte aus genomischer DNA bis zu einer Größe von 15 kb amplifiziert werden. Ein derartiges System findet in der ExpandTM Long Template PCR (Roche Pharma) seine Anwendung. Hier wird die *Pwo*-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* als Korrekturleseenzym eingesetzt. Da während der PCR theoretisch bei jedem Zyklus die betreffende Sequenz verdoppelt wird, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg ihrer Konzentration, so dass am Ende eine bis zu 109-fache Vermehrung des gewünschten Fragments erreicht werden kann.

Ein Reaktionsansatz für ca. 100 pg Plasmid- oder 100 ng HMW-DNA (Volumen 25 µl) besteht aus folgenden Komponenten:

2,5 µl 10x PCR-Puffer	13-22,5 mM MgCl ₂ , 500 mM Tris-HCl, pH 9,2 (25°C), 160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
100-200 µM dNTP-Mix	Stammlösungen je 25 mM aller vier Nukleotide (Pharmacia)
je ~15 pmol Primer A u. B	Stammlösungen mit 10 pmol/µl
H ₂ O	Millipore-Qualität
1-3 U Taq- bzw. Pwo-Polymerase	

Eine Überschichtung der Reaktionsvorlage mit Mineralöl ist nicht nötig, da die verwendete PCR-Maschine eine Deckelheizung besitzt.

Ein typisches Temperaturprofil beginnt zunächst mit einem initialen DNA-Denaturierungsschritt (5 min, 94 °C). Nun schließen sich die Temperaturzyklen an, die typischerweise 20- bis 30-mal wiederholt werden: die doppelsträngige DNA wird zunächst bei einer hohen Temperatur denaturiert (a). Danach erfolgt bei einer niedrigen Temperatur die Bindung der Primer, die komplementär zu den jeweiligen 3'-Grenzen des Zielsegments sind (b) und die Elongation (c). Die Laufzeit des Elongationsschrittes richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Man geht etwa von 1000 bp / min Synthesegeschwindigkeit aus.

(a) 94 °C	30 s
(b) 60 °C – 66 °C	60 s
(c) 68 °C	120 - 300 s

Man schließt den Temperaturzyklen noch einen einzelnen Elongationsschritt von 7 bis 10 min bei 68 °C an, um ein Fertigstellen noch nicht beendeter Sequenzen zu ermöglichen.

4.8 Radioaktive Nachweismethoden

4.8.1 DNA-Markierung mit dem "Rediprime DNA Labelling System"

Labelling-Mix (Fa. Amersham Life Science): dATP, dGTP, dTTP, exonukleasefreies Klenow-Enzym, Oligonukleotidprimer (9mer).

25-50 ng DNA werden in einem Endvolumen von 45 µl in einem Eppendorfgefäß für fünf Minuten bei 100°C denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt. Anschließend wird der Ansatz in den Labelling-Mix pipettiert, nach Zugabe von 5 µl α-32P-dCTP (3000 Ci/mmol) gemischt und für 10-60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Anschließend werden nicht eingebaute Nukleotide über eine Sephadex-Säule abgetrennt.

4.8.2 Klenow-Markierung

Zur Größenbestimmung von Fragmenten im Southern Blot wird ein mit 35S-dATP markierter Größenmarker (Lambda-DNA, *Hind*III und *Eco*RI verdaut) eingesetzt. Dazu markiert man die verdaute λ-DNA durch eine Auffüll-Reaktion mit dem Klenow-Enzym. Man versetzt den Verdauungsansatz (ca. 1 µg DNA in einem Volumen von 20 µl) mit 2 µl Nukleotid-Mix, 4 µl α-35S-dATP (>1000 Ci/mmol) und 2 U Klenow. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C und Abstoppen mit 20 µl Stopp-Mix erfolgt die Aufreinigung über eine Sephadex G50 Säule.

4.8.3 „Southern Blotting“

(Southern, 1975)

4-10 µg der aufgereinigten, hochmolekularen DNA werden mit 2 µl des jeweiligen 10-fachen Restriktionspuffers, 0,5 µl TE/RNase (10 µg/ml) sowie 20 U des entsprechenden Restriktionsenzym versetzt und über Nacht im Gesamtvolumen von 20 µl bei der spezifischen Temperatur des Enzyms inkubiert. Danach wird die DNA direkt mit 5 µl 6x Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch in einem 0,8 bis 1,2 %-igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Als Größenstandard wird ein mittels Klenow-Enzym 35Smarkierter Verdau von λ-DNA verwendet. Bei all diesen Schritten ist es wichtig, auf eine intensive Durchmischung der eingesetzten, teilweise viskosen Lösungen zu achten. Der Transfer der DNA vom Gel auf die positiv geladene Nylonmembran erfolgt mit 0,4 M NaOH. Lange DNA-Fragmente (>5 kb) können vor dem Transfer mittels 0,25 M HCl (ca. 30 Minuten) depuriniert werden, so dass sie während des alkalischen Transfers in Teilfragmente zerfallen

und leichter aus dem Gel austreten können. Das Gel wird anschließend mit 0,4 M NaOH neutralisiert und in die Blotapparatur überführt: das Gel liegt mit der Unterseite nach oben oberhalb des Flüssigkeitsspiegels auf einem feuchten, exakt auf Gelbreite zugeschnittenen Filterpapierstreifen (Whatman 3MM), dessen gegenüberliegende Ränder in das Pufferreservoir (0,4 M NaOH) eintauchen. Unter dem Filterpapier sollten mehrere Lagen Filterpapier liegen, die nicht mit der Flüssigkeit in Berührung stehen. Auf das Gel wird die Nylonfolie gelegt, die zuvor in 0,4 M NaOH gewässert wurde. Luftblasen zwischen Gel und Membran sind sorgfältig zu entfernen. Auf die Membran werden zwei Lagen mit 0,4 M NaOH angefeuchtetes und eine Lage trockenes Filterpapier geschichtet. Nach oben schließt ein Stapel saugfähiges Papier (z.B. „Tork“) die Anordnung ab. Die Apparatur wird vorsichtig mit einer Glasplatte und einem Gewicht (ca. 500 g) beschwert. Der Transfer sollte mindestens 6 Stunden, meist jedoch über Nacht erfolgen. Bei Durchfeuchtung sollte der Papierstapel gewechselt werden. Anschließend wird die Nylonfolie in 2x SSC neutralisiert, 2 Stunden bei 80 °C gebacken und zur Hybridisierung weiterverwendet.

4.8.3.1 Hybridisierung und Waschen

Hybridisierung mit Dextransulfat-Hybridisierungslösung:

Hybridisierungslösung (in Aliquots à 20 ml bei –20°C aufbewahren)

1 M NaCl

50 mM Tris, pH 7,5 (bei 37 °C)

10 % Dextransulfat

1 % SDS

250 µg/ml Salmon Sperm DNA (sonifiziert)

H₂O

Prähybridisierung und Hybridisierung:

20 ml der Hybridisierungslösung werden bei 65 °C aufgetaut, für 10 Minuten aufgeköcht und wieder auf 65 °C abgekühlt. Die Lösung wird in ein Glasröhrchen für den Hybridisierungsofen gefüllt und die mit H₂O angefeuchtete Membran mit der DNA-freien Seite an die Glaswand eingelegt. Die Prähybridisierung erfolgt bei 65 °C im Hybridisierungsofen für mindestens 1 Stunde. Die denaturierte radioaktiv markierte Probe wird hinzugefügt und die Hybridisierung erfolgt bei gleichen Bedingungen über Nacht. Die Oberfläche der Membran darf durch zu grobe Handhabung nicht verletzt werden, des Weiteren sollten sich zwischen Membranrückseite und Glaswand keine Luftblasen befinden.

Waschen:

Der Röhrcheninhalt wird in den radioaktiven Abfall entleert und die Membran vorsichtig entnommen.

Waschschritte:

1. 2x SSC / 0,5 % SDS (ca. 250 ml) 5 min RT
2. 2x SSC / 0,5 % SDS (500 bis 1000 ml) 30 min 65 °C
3. 2x SSC / 0,5 % SDS (250 bis 500 ml) 5 min 65 °C

Anschließend kann die Membran feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert werden. Trocknen der Membran führt zu irreversibler Bindung und macht nachträgliches Waschen und Rehybridisieren unmöglich.

Rehybridisierung:

Zur Rehybridisierung wird die Aktivität durch Waschen unter den für die benutzte Membran angegebenen 'Strip'-Bedingungen entfernt. Für die Hybond-XL Membran wird kochendes 0,5 %iges SDS in 0,1x SSC auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur geschüttelt, bis die Lösung abgekühlt ist. Die vollständige Ablösung der radioaktiven Probe wird durch anschließende Exposition sichergestellt. Erneute Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgen wie gehabt.

4.8.4 „Northern Blotting“

10x MOPS 0,2 M Morpholinopropansulfonsäure, 10 mM EDTA, 10mM NaAc
pH 7 mit NaOH 10M

20x SSC

(Prä)Hybridisierungslösung:

1 ml 10% SDS, 1g Dextran, 0,6 g NaCl, 333 µl Hefe-RNA (5 mg/ml), 333µl Heringssperm-DNA (5 mg/ml), H₂O ad 10 ml.

Auftragspuffer:

0,85 ml H₂O, 0,15 ml 10x MOPS, 0,24 ml Formaldehyd 37%, 0,08ml Bromphenolblau-Lsg. 10%; Lagerung bei -20°C

1,2 g Agarose werden in 72 ml H₂O durch Aufkochen gelöst und auf 55°C abgekühlt. Danach werden 10 ml 10x MOPS und 18 ml 37%ige Formaldehydlösung hinzugefügt und gut gemischt. Anschließend wird die Lösung in einen Gelträger überführt und für mindestens 1 h polymerisiert.

Je Probe werden 5 µg RNA in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 10 µl Auftragspuffer aufgenommen. Es folgen 10 Minuten bei 65°C und 5 Minuten auf Eis. Anschließend wird jede Probe mit 1 µl Ethidiumbromidlösung (400 µg/ml) und 1 µl „RNA staining solution“ versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei 25V über Nacht in 1x MOPS-Puffer durchgeführt. Als Größenstandard dient eine RNA-Leiter (0,5 – 10 kb, Invitrogen). Das Formaldehyd-Agarosegel wird dann 5 Minuten in H₂O und anschließend zweimal 15 Minuten in 10x SSC geschwenkt. Danach erfolgt der Aufbau der Blotapparatur analog zum Southern Transfer, allerdings erfolgt der Transfer in diesem Fall mit 10x SSC über Nacht. Als Membran dient eine Nylonfolie (GeneScreenPlus, NEN), die vor Gebrauch kurz in H₂O angefeuchtet wird. Nach dem Transfer wird die Membran mehrfach in 2x SSC geschwenkt, zwischen zwei Lagen Whatman 3MM Papier luftgetrocknet und anschließend 2 Stunden bei 80 °C gebacken.

Die Prähybridisierung erfolgt analog zu der für DNA-Blots, wird jedoch bei 60 °C durchgeführt und sollte mindestens 20 Minuten dauern. Die denaturierte radioaktiv markierte Probe wird hinzugefügt und die Hybridisierung erfolgt bei 60°C über Nacht.

Nach dem Entfernen der Hybridisierungslösung wird die Nylonfolie zunächst innerhalb des Röhrchens kurz mit 2x SSC gewaschen und dann aus dem Röhrchen in eine Instrumentenschale überführt. Anschließend wird die Membran für 5 Minuten in 2x SSC und dann mindestens zweimal für 15 Minuten mit einer auf 60°C vorgewärmten Lösung von 2x SSC/1% SDS gewaschen. Die Zahl der Waschschrte hängt von der mittels eines Handmonitors gemessenen Aktivität ab. Zum Abschluss erfolgt ein fünfminütiger Waschschrte mit 0,1x SSC. Der Blot wird nun in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert.

4.9 Gelelektrophorese

4.9.1 Agarose-Gelelektrophorese

Laufpuffer (TAE): 40 mM Tris/Acetat (pH 7,5)
 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA

5x Stop-Puffer: 15 % Ficoll
 50 mM EDTA
 1x TAE
 0,05 % Bromphenolblau

0,05 % Xylencyanol

Zur Anfertigung eines 1%igen Standardgels wird 1 g Agarose in 100 ml Laufpuffer aufgenommen und in einem Mikrowellenherd so lange gekocht, bis keine sprudelnde Blasenbildung mehr zu beobachten ist. Dann wird die flüssige Agarose mit 1 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) vermischt und in eine Gelkammer gegossen. Zur Formung der Geltaschen wird ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren wird das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen des 5x-Stop-Puffers versetzt. Für die Erkennung der Größe eines Fragments werden Größenstandards parallel mit aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei ungefähr 100 V und 30 mA durchgeführt. Je nach Größe der Fragmente werden die DNA-Banden nach 0,5-3-stündiger Laufzeit fotografiert. Für eine präparative Gewinnung der DNA-Fragmente können die Banden unter UV-Licht (360 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden.

4.10 Arbeiten mit eukaryotischen Zellkulturen

4.10.1 Verwendete Zelllinien

CHO-K1: *chinese hamster ovary* (ATCC 9618-CRL)

NIH3T3: embryonale Mausfibroblasten-Zellen (ATCC 1658-CRL)

HEK293: *human embryonic kidney* (ACC305)

4.10.2 Medien und Lösungen

PBS : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 6,8 - 7,0 mit 1 N NaOH einstellen; bei 4°C lagern.

TEP : 6 mM EDTA, 0,1-0,2 % Trypsin (Fa. Gibco) in PBS

Penicillin/Streptomycinlösung (100x):

1,212 g Ampicillin/200 ml (10000 U/ml),

2 g Streptomycin/200 ml (10 mg/ml), zum Lösen mit NaOH auf pH 7,4 einstellen,

(bei -20°C lagern)

Medium für CHO-K1-Zellen:

Nut. Mix F-12 (HAM) mit Glutamax-1 (L-Alanyl-L-Glutamin), Fa. Gibco. Vor Gebrauch wird dem Medium 10% FCS sowie 1/100 Volumen Penicillin/Streptomycinlösung zugesetzt und gut gemischt.

Medium für NIH3T3- und HEK293-Zellen:

DME-Medium (Dulbecco's Modification of Eagles Medium), Fa. Flow, mit 1/100 Volumen 1 M HEPES und 3,75 g/l NaHCO₃. Vor Gebrauch wird dem Medium 10% FCS, 1/100 Volumen Glutaminlösung sowie 1/100 Volumen Penicillin/Streptomycinlösung zugesetzt.

4.10.3 Kultivierung von Zelllinien

Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ in einem nassbegasteten Brutschrank kultiviert. Für die verwendeten Zelltypen werden die oben angegebenen Medien verwendet. Je nach Zelldichte sollte alle 2 bis 5 Tage das Medium gewechselt werden. Sind die Zellen konfluent, werden sie umgesetzt (passagiert).

4.10.4 Passagieren

Die zu passagierenden Zellen werden vom Medium befreit und mit PBS gewaschen. Das PBS wird abgesaugt und die Zellen mit einem dünnen Film TEP überschichtet. Nach einigen Minuten lösen sich die Zellen von der Oberfläche. Die Zellsuspension wird zur Inaktivierung des Trypsins in mindestens der doppelten Menge serumhaltigen Mediums aufgenommen. Noch lose auf dem Boden des Kulturgefäßes haftende Zellen werden mit Hilfe einer Pipette abgespült. Ein Aliquot der Zellsuspension wird gezählt und die Zellen in der gewünschten Konzentration in einem neuen Kulturgefäß mit frischem Medium ausgesät.

4.10.5 Langzeitlagerung von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen einer kleinen Flasche (ca. 3×10^6 Zellen) werden mit PBS gewaschen und mit 1 ml TEP abgelöst. Man nimmt die Zellsuspension in 4 ml Medium auf und zentrifugiert 5 Minuten bei 1000 rpm (Hettich Rotanta/S). Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen werden in 2 ml kaltem FCS mit 5,6 % DMSO aufgenommen, auf 3 bis 4 Einfrierröhrchen (Bio-Freeze-Vials, Fa. Costar) aliquotiert und sofort auf Eis gestellt. Man belässt die Röhrchen maximal 60 Minuten auf Eis, verpackt sie in Zellstoff und lagert sie in Styroporkästen bei -70°C. Nach ca. 12 Stunden können sie in flüssigen Stickstoff überführt werden. Um die Zellen

möglichst wenig Stress im Verlauf des Einfrierprozesses auszusetzen, wurde eine Einfrierbox der Firma Nalgene (Nalgene® Cryo, 1 °C Freezing Container) verwendet. Hierbei werden die Zellen nach dem Überführen in die Einfrieröhrchen in die Vertiefungen der Einfrierbox gestellt und bei –70 °C gelagert. Dabei kommt es durch das Isopropanol zu einem stufenweisen Herunterkühlen der Zellen in 1°C-Schritten. Das Auftauen der Zellen sollte möglichst schnell erfolgen. Dazu erwärmt man die Röhrchen im 37 °C-Wasserbad und nimmt die Zellsuspension in 10 ml Medium auf, um das DMSO zu verdünnen. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, das Zellpellet in 5 ml frischem Medium aufgenommen und in eine kleine Flasche überführt.

4.10.6 Gentransfermethoden

4.10.6.1 Transfektion mittels „GenePORTER™ 2 Transfection Reagent“ (Peglab)

Vier Stunden vor der Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel mit serumfreiem Medium. Für die Transfektion von am Vortag ausgesäten Zellen (ca. 3×10^5) auf einer 6-Loch-Zellkulturplatte wird 1 µg DNA mit *DNA diluent B* auf ein Volumen von 25 µl verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. In einem anderen Gefäß werden 3,5 µl des GenePORTER™2-Reagenz mit 21,5 µl serumfreiem Medium gemischt. Die DNA-Lösung wird vorsichtig zu der GenePORTER™2-Lösung gegeben. Es wird nicht gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wird die Mischung vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel.

Modifikation zur Transfektion niedrig konzentrierter DNA-Lösungen (*Minicircle*-DNA)

Am Vortag auf 6-Loch-Platten ausgesäte Zellen (3×10^5) werden mit etwa 15-25 µl *Minicircle*-DNA (Konzentration 50-100 ng/µl) transfiziert. Das Transfektionsvolumen beträgt 1 ml serumfreies Medium. Die *Minicircle*-DNA wird auf mit *DNA diluent B* auf 50 µl aufgefüllt und 5 min bei RT inkubiert. Es werden 10 µl des GenePORTER™2 - Reagenz mit 40 µl serumfreiem Medium vermischt eingesetzt (s.o.).

4.10.7 Durchführung einer Selektion

In der Regel wird das Medium einen Tag nach der Transfektion bzw. Elektroporation gewechselt. Dabei werden die Zellen mit dem entsprechenden Selektionsmedium versetzt, das alle 2-3 Tage erneuert wird. Klone erscheinen je nach Selektion und Zelltyp 8-12 Tage später. Die Klone werden, wenn sie Stecknadelkopfgröße erreicht haben, auf der Plattenrückseite mit Hilfe eines Filzstifts markiert, gezählt und die

Zählung unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend können Klone isoliert, als Mischung weiterverwendet oder subkloniert werden. Die zur Selektion verwendeten Drogenkonzentrationen sind vom Zelltyp abhängig und müssen vorher ausgetestet werden.

CHO-K1-Zellen: 500 µg/ml G418

NIH3T3-Zellen: 800 µg/ml G418

4.11 Durchflusszytometrie

4.11.1 Nachweis von GFP im FACS und *Sorting* mittels FACS

FACS-Puffer: PBS + 2% hitzeinaktiviertes FCS (30 min bei 55°C im Wasserbad)

Gentamycin: Stock (10 mg/ml), im Medium 5 µl/ml

Propidiumjodid

Die Eigenfluoreszenz des GFP-Proteins erlaubt die Lebendanalyse der Expressionshöhe einzelner Zellen. Hierzu müssen nicht konfluente Zellen abtrypsinisiert und im EPICS-Puffer aufgenommen werden. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert und die Zellen werden anschließend in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in EPICS-Puffer aufgenommen. Die Zellen können so etwa eine halbe Stunde auf Eis ohne Schaden überstehen. Für eine Sortierung empfiehlt sich die Vereinzelung der Zellen, indem man die Zellsuspension durch eine feine Gaze laufen lässt. Damit nur lebende Zellen gemessen werden, wird Propidiumjodid zur Anfärbung toter Zellen in die Zellsuspension gegeben (2 µM). Das GFP-Protein weist bei einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm eine Eigenfluoreszenz auf. Sortierte Zellen sollte vier Tage in Gentamycin-haltigem Medium kultiviert werden.

4.11.2 Zellzyklusanalyse

Die zu analysierenden Zellen wurden in PBS gewaschen, mit 1x TEP von der Kulturschale abgelöst und in 2 ml FACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml 80%igen Methanol/PBS (-20°C) unter kontinuierlichen Schütteln (Vortexen) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zur Fixierung über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde 5 ml 0,1% (w/v) Saponin in PBS zu den Zellen gegeben, der Ansatz gevortext und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und der Waschschrift wiederholt. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen mit 1 mg/ml Rnase S, 20 µg/ml Propidiumjodid und 0,1% (w/v) Saponin in PBS. 125 µl

dieser Färbelösung wurde auf das Zellpellet pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 bis 45 min bei Dunkelheit wurde das Zellpellet weitere zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend am FACS vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm ModFit LT.

4.12 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

4.12.1 Metaphase-spreads

Um Metaphasechromosomen aus Zellen zu isolieren, müssen sich die Zellen in einem aktiven Replikationszyklus befinden, d.h. sie dürfen nicht konfluent sein. Durch Zugabe von 0,04 µg Colcemid (Stocklösung 10 µg/ml) pro ml Kulturmedium 2 bis 4 h vor der Zellernte kann der Anteil an sich in der Mitose befindenden Zellen erhöht werden. Colcemid wirkt als Spindelgift, das sich teilende Zellen in der Metaphase der Mitose arretiert. Nach bis zu 4 h Inkubationszeit werden die Zellen mit Trypsin geerntet, der alte Medienüberstand wird zum Abstoppen der Trypsinwirkung eingesetzt. Der Medienüberstand enthält möglicherweise mitotische Zellen, die sich aufgrund des größeren Zellvolumens von der Kulturschale abgelöst haben. Die Zellen werden auf vier 2 ml Eppendorfgefäße verteilt und bei 400 x g pelletiert. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet in der Restflüssigkeit durch vortexen resuspendiert und anschließend 1,5 ml hypotonische Salzlösung zugegeben. Die Salzlösung besteht entweder aus 0,075 mM KCl oder einer Mischung aus 0.9% Natriumcitrat und KCl im Verhältnis 1:1 oder 1:20. Nach 1 bis 5minütiger Inkubationszeit werden die Zellen bei 400 x g pelletiert und mit 1,5 ml kalter Methanol/Eisessig (3:1) Lösung 10 bis 30 min auf Eis fixiert. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt, bevor die Zellen über Nacht im Kühlschrank fixiert werden. Am nächsten Tag werden die Zellen noch zweimal mit der Fixierungslösung gewaschen und anschließend ca. 20 µl der Zellsuspension auf einen eiskalten Objektträger getropft. Die Tropfhöhe beträgt ca. 30 cm. Die getropften Präparate werden kurz durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen, getrocknet und die Qualität unter einem Lichtmikroskop bewertet und sie werden bei -20°C gelagert.

4.12.2 Herstellung der DNA-Sonden mittels Nick-Translation

Die Methode der Nick-Translation beruht darauf, dass DNase I bei niedriger Enzymkonzentration an statistisch verteilten Stellen eines DNA-Substrates Einzelstrangsnitte, sogenannte *nicks*, erzeugt. DNA-Polymerase I benutzt die entstehenden 3'-OH-Enden als Primer für die DNA-Synthese. Die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der DNA Polymerase entfernt dabei gleichzeitig die Nukleotide in

Syntheserichtung. Die durch die Exonuklease-Aktivität abgebauten Nukleotide werden durch die Polymerase-Aktivität mit markierten Nukleotiden ersetzt.

Nick Translation in 100 µl Volumen (alles Invitrogen-Kit, -20°C):

10 µl Puffer

10 µl Enzymmix

2 µg DNA

10 µl dNTPs 10mmol

1 µl Spectrum Red/Green dUTP (Abbott Molecular Inc.; 50 nmol)

add H₂O

Die Nick-Translationsreaktion wird für 90-180 min bei 15°C inkubiert. Da die Hybridisierungseffizienz stark von der Fragmentgröße der markierten Sonde abhängt, wird die Fragmentgröße vor dem Abstoppen der Reaktion auf einem Agarosegel überprüft. Sonden mit durchschnittlichen Fragmentgrößen oberhalb des optimalen Bereichs von 200-500 Nukleotiden resultieren meist in fleckigen Hintergrundsignalen, die durch unspezifische Anheftung der Sonde an die Glasoberfläche entstehen. Außerdem kann die Hybridisierungseffizienz aufgrund der Zugänglichkeit verringert werden. Sonden mit extrem kurzen Fragmenten dagegen beeinträchtigen die Sensitivität aufgrund der schnellen Rehybridisierungskinetik. Bei Erreichen der optimalen Fragmentgröße wird die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8 und Erhitzen auf 65°C für 10 min gestoppt. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch eine Alkoholfällung abgetrennt. Die markierten Sonden werden bei -20°C gelagert.

4.12.3 *In situ* Hybridisierung

Hybridisierungspuffer: 6,5 ml Formamid, 1,3 ml 20x SSC, 0,65 g Dextransulfat, 1 ml Heringssperm-DNA (c = 1 mg/ml), 26 µl 0,5 M EDTA, 1,3 ml NaH_xPO_x-Puffer (0,5 M), pH 7,4

Denaturierungslösung: 70% deionisiertes Formamid in 2x SSC

10x PBD-Puffer: Fa. Qbiogene

Die zu hybridisierenden Objektträger werden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und in einer Lösung von Methanol/Eisessig (3:1) für 10 min refixiert. Die Objektträger werden getrocknet und anschließend in 70%iger Formamidlösung bei 72°C für 2 min denaturiert. Durch ansteigende Konzentrationen an Ethanol (70%, 90% und 100%) werden die Präparate dehydriert und bei Raumtemperatur getrocknet. 10 µl der markierten DNA-Sonde (4.12.3.) werden mit 10 µl Cot-DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat und

200 µl eiskaltem Ethanol gefällt. Das Pellet wird später in 10 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen, und die Lösung wird bei 80°C für 10 min im Heizblock denaturiert. Die Sonde wird bis zum Gebrauch auf Eis gelagert. Zur Hybridisierung wird die Sonde auf das zu untersuchende Präparat gegeben und mit einem Plastikdeckgläschen bedeckt. Die Ränder werden mit Kleber zum Schutz vor Austrocknung versiegelt. Die Hybridisierung erfolgt in einer feuchten Kammer bei 37°C über Nacht.

4.12.4 Mikroskopische Auswertung der *in situ* Hybridisierungen

Die Bildauswertung von Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen erfolgt unter einem Durchlichtmikroskop (Zeiss) über eine digitale CCD-Kamera. Die Auflösung der Kamera beträgt 1317 x 1035 Pixel. Standardmäßig wird bei Verwendung der CCD-Kamera ein 63er Ölimersionsobjektiv benutzt. Ein Filtersatz von OmegaOptical ermöglicht die Trennung von roter, grüner und blauer Fluoreszenz (Rot: Anregung = 540nm, Emission = 585 nm; Grün: Anregung = 475 nm, Emission = 535 nm; Blau: Anregung = 387 nm, Emission = 535 nm). Die erhaltenen Bilder werden mit Hilfe der Software IPLab Spectrum (Signal Analytics) bearbeitet. Diese ermöglicht die nachträgliche Kolorierung der schwarz/weiß Abbildungen, eine Überlagerung derselbigen und die Prozessierung auf 8 bit TIFF-Dateien.

4.13 Produktion und Aufreinigung von *Minicircle*-DNA

4.13.1 Vermehrung und Rekombination der DNA in MM294-Flp-*E. coli*-Zellen

Das Parentalplasmid wird in kompetente MM294-Flp-Zellen (s. 4.4.1) elektrotransformiert. Nach dem Puls werden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Kapsenberg Röhrchen überführt und bei 30°C etwa 40 Minuten geschüttelt. Unterschiedliche Mengen des Transformationsansatzes werden auf Kanamycin-haltigen Agarplatten (25 µg/ml) ausplattiert. Man lässt die Klone über Nacht Stunden bei 30°C heranwachsen. Die Klone werden über eine „Mini“-Plasmidpräparation durch einen geeigneten Restriktionsverdau charakterisiert.

Die zu präparierenden Bakterienklone werden in 200 ml LB-Medium mit Kanamycin-Zusatz (25 µg/ml) als Schüttelkultur über Nacht (etwa 16 Stunden) inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Kultur bei 4000 rpm abzentrifugiert (10 min, 4°C) und das Pellet mit etwa 50 ml LB-Medium abgelöst (gewaschen). Nach erneutem Zentrifugieren (siehe oben) wird das Pellet in 120 ml frischem LB (ohne Antibiotikum) aufgenommen.

Die Kultur wird nun zur Induktion der Rekombinase-Expression 20 min bei 40°C in einem Wasserbad (mit Schüttler oder unter Schwenken von Hand) inkubiert. Danach erfolgt eine Inkubation von 2,5 Stunden bei 35°C (180 rpm) und anschließend eine Wiederholung des 20minütigen Hitzeschocks bei 40°C. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 35°C wird die Kultur abzentrifugiert (10 Minuten, 5000 rpm). Es folgt eine Plasmidpräparation mit dem Qiagen „Plasmid Maxi Preparation-Kit“ über eine Qiatip500-Anionenaustauscher-Säule nach Herstellerangaben. Das Bakterienpellet kann vorerst auch über Nacht bei –20°C gelagert werden.

4.13.2 Aufreinigung der *Minicircle*-DNA aus dem Plasmid-Gemisch durch Gelextraktion

150 ml frische 1%ige TAE-Agarose werden mit 3-4 µl Ethidiumbromid (5mg/ml) vermischt und daraus ein mittelgroßes Gel gegossen (BRL Gelelektrophorese-Kammer Horizon 1114). Zur Formung großer Taschen (etwa 180 µl Fassungsvermögen) werden je drei Zinken eines dicken Kamms mit Tesa-Film zusammengeklebt. Pro Tasche wird 15 µg der Plasmid-DNA in einem Volumen von 150 µl mit dem Restriktionsenzym *HindIII* (oder einem anderen *single cutter* im Plasmidrückgrat) für ca. 2 Stunden im Thermoschüttler bei 37°C verdaut. Der Restriktionsverdau wird mit 25 µl 6x Probenpuffer versetzt und das Gel beladen. Es wird etwa 15µl 1kb-Marker aufgetragen. Nach einem Gellauf bei 80 V für ca. 4 Stunden wird die *supercoiled Minicircle*-Bande (auf der Höhe von 3 kb) unter UV-Licht ausgeschnitten.

Die Gelstücke werden ausgewogen und die DNA mit dem Qiagen Gel Purification Kit nach Herstellerangaben extrahiert (s. 4.5.3). Die Gelstücke werden im Wasserbad bei 37°C im Puffer QG gelöst. Die Elution der DNA von der Säule erfolgt mit dem kleinstmöglichen Volumen (max. 30 µl) 1x TE (10 mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8,0). Wenn anschließend eine weitere Aufreinigung mit ATP-abhängiger DNase vorgesehen ist, wird die DNA mit H₂O eluiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch und/oder elektrophoretisch bestimmt (siehe 4.3.3).

4.13.3 Aufreinigung der gelextrahierten DNA mit ATP-abhängiger DNase (optional)

Zur Beseitigung linearisierter *Minicircle*-DNA kann nach der Gelextraktion eine Aufreinigung mit ATP-abhängiger DNase erfolgen. Dazu werden 42 µl der DNA-Lösung aus der Gelextraktion mit 5 µl 10x Plasmid Safe™ Reaction Buffer, 2 µl ATP-Lösung (25mM) und 1 µl Plasmid-Safe™ ATP-dependent DNase (alles Fa. Epicentre, zu beziehen über Biozym Scientific GmbH) für 30 min unter leichtem

Schütteln bei 37°C inkubiert. Die anschließende Rückgewinnung der DNA erfolgt mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

4.13.4 Alternative Aufreinigung der *Minicircle*-DNA

Alternativ kann die Hydrolyse der linearisierten DNA durch die ATP-abhängige DNase direkt nach dem HindIII-Verdau des Plasmidgemischs erfolgen. Dazu werden 8 µg des Plasmidgemischs in einem Volumen von 100 µl mit dem Restriktionsverdau *Hind*III (oder einem anderen *single cutter* im Plasmidrückgrat) für mindestens 3h im Thermoschüttler bei 37°C verdaut. Die DNA wird mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (s.o.) rückgewonnen und mit 83 µl H₂O eluiert. Alternativ kann die DNA mit 0,6M LiCl in 100% Ethanol gefällt werden (s. 4.3.2). Die DNA-Lösung wird 10 µl 10x Plasmid Safe™ Reaction Buffer, 5 µl ATP-Lösung (25mM) und 2 µl Plasmid-Safe™ ATP-dependent DNase für weitere 3h inkubiert. Es folgt eine Reinigung des Verdaus mit dem Qiagen PCR Purification Kit mit anschließender Elution der DNA im kleinstmöglichen Volumen TE.

4.14 Plasmide und Oligonucleotide

4.14.1 Primer

gfp fwd1 5' - ATC GAG CTG AAG GGC ATC GAC T - 3'
gfp rev1 5' - CCG GTG GTG CAG ATG AAC TTC A - 3'
sar fwd 5' - CAG CTA TCT GTG CTG TCG CCT A - 3'
sar rev 5' - CTC ATG TCT CCT TGG GTT CCT C - 3'
mini1 5' - GAC AAC CAC TAC CTG AGC AC - 3'
mini2 5' - GGT TCA CGT AGT GGG CCA TC - 3'
AgeXhoSV40 fwd 5' - CGA CCG GTA CTC GAG ATG TGT GTC AGT TAG
 GGT G - 3'
AgeSV40 rev 5' - GACGACCGGTATCCTGTCTCTTGATCGATC - 3'

4.14.2 Plasmide

pEpi-FGSARF

Die 5'-vom neo^r-Gen gelegene FRT-site des Vektors pFRToli-neo (Nehlsen, 2004) wurde mittels *HindII/RsrII* in das 6,0 kb große *StuI/RsrII*-Fragment des Vektors pEpi-eGFP (Jenke et al., 2004) inseriert. Die 3'-vom cmv-Promotor gelegene FRT-site im pFRToli-neo wurde durch *BspLu11I/NheI* exzisiert und in das 6,2 kb große *BspLu11I/NheI*-Fragment des pEpi-eGFP+FRT5' inseriert (Nehlsen, 2004).

[FRT] - [eGFP] - [S/MAR SAR E] - [SV40 polyA] - [SV40 ori/Promotor] - [FRT] - [neo^r/kana^r]-[cmv-Promotor]

pEpi-delCFG SARF

Der cmv-Promotor des Vektors pEpi-FGSARF wurde durch *SpeI/BspLu11I* exzisiert und das resultierende 6,4 kb große Fragment nach Auffüllen der Enden mittels Klenow-Enzym ligiert. (Quelle: Nehlsen, Braunschweig)

[FRT] - [eGFP] - [S/MAR SAR E] - [SV40 polyA] - [SV40 ori/Promotor] - [FRT] - [neo^r/kana^r]

pEpi-delCM18

Das 2 kb große SAR E-S/MAR des Vektors pEpi-delCFGsARF wurde mit *AseI/SalI* deletiert und das 0,7 kb große *AseI/SalI* geschnittene PCR-Fragment (*gfp fwd1/gfp prev1*) aus dem CHO-K1-Klon M18 inseriert.

[FRT] - [eGFP] - [S/MAR M18] - [SV40 polyA] - [SV40 ori/Promotor] - [FRT] - [neo^r/kana^r]

pEpi-FGM18F

Das 2 kb große SAR E-S/MAR des Vektors pEpi-FGSARF wurde mit *BglII/SalI* deletiert und das 0,7 kb große *BglII/SalI*-Fragment aus pEpi-delCM18 in den Vektor inseriert.

[FRT] - [eGFP] - [S/MAR M18] - [SV40 polyA] - [SV40 ori/Promotor] - [FRT] - [neo^r/kana^r]-[cmv-Promotor]

pMDIS-egfp

pMDIS-eGFP: Kodiert das *enhanced* GFP unter einem SV40-Promotor (Quelle: Hennecke, Braunschweig).

pMARS-egfp

Das egfp-Gen des Vektors pMARS (Quelle: Lipps, Witten) wurde mit *BglII* geschnitten und die Enden mit Klenow aufgefüllt. Dann wurde mit *AgeI* verdaut und so das eGFP-Gen (das kein Stopcodon besaß) exzidiert. Der Vektor pMDIS-egfp wurde mit *NotI* geschnitten, die Enden mit Klenow aufgefüllt und anschließend das eGFP-Gen mit *AgeI* exzidiert. Dieses 0,7 kb große *blunt end/AgeI*-Fragment wurde in den Vektor pMARS inseriert.

[cmv-Promotor] – [eGFP] – [Tetramer-S/MAR] - [SV40 polyA] - [SV40 ori/Promotor] - [neo^r/kana^r]

pGFP-C1

Clontech (nicht mehr erhältlich); GenBank Accession #: U19280

pEpi-SV40MC_M18

Zur Insertion eines Promotors vor das eGFP-Gen wurde eine PCR-Amplifikation des SV40-Promotor/Enhancers aus pGFP-C1 mit *AgeXho/SV40fwd/AgeSV40rev* durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit *AgeI* verdaut und in den *AgeI*-geschnittenen Vektor pEpi-delCM18 ligiert.

4.14.3 Minicircle-DNA

Minicircle PF-M18; hergestellt durch PlasmidFactory GmbH, Bielefeld.

Minicircle-Sequenz = *XhoI/DraIII*-Fragment aus pEpi-SV40MC_M18 inseriert in Parentalplasmid der PlasmidFactory (Mayrhofer et al., 2008).

[SV40 ori/Promotor] – [eGFP] – [S/MAR M18] - [SV40 polyA]

MC07.SV40-eGFP-S/MAR; Lot-No. PF902-08101

5. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillinresistenz-Gen
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CHO-K1	Chinese hamster ovary-Zellen
cm	Zentimeter
cmv	Cytomegalovirus-Promotor
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N steht für Adenosin, Cytidin, Guanosin und Thymidin)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
ES	Embryonale Stammzellen der Maus
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting

FCS	fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Flp	Flp-Rekombinase
Flpe	Flp-Rekombinase enhanced
<i>frt</i>	FLP recognition target
g	Gramm
G	Guanin
G418	Aminoglycosid-2'-Deoxystreptin (Gentamycin-Derivat)
Ganc	Ganciclovir
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HMW-DNA	<i>High Molecular Weight</i> -DNA
HSV-TK	Herpes simplex virus Thymidinkinase
IFN	Interferon
IRES	Internal Ribosome Entry Site
Kana	Kanamycin
kb	1000 Basenpaare
kDa	1000 Dalton
kV	1000 Volt
M	molar
mA	Milliampère
MAR	<i>Matrix Attachment Region</i>
MC	<i>Minicircle</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MEL	murine Erythroleukämiezelllinie
min	Minute

ml	Milliliter
MP	Miniplasmid
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
neo	Neomycin-Phosphotransferase
nm	10 ⁻⁹ Meter
OD	optische Dichte
Ori	<i>Origin of replication</i>
p	Plasmid
pA	Polyadenylierungssignal
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEV	<i>Position Effect Variegation</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
pmol	10 ⁻¹² Mol
polyA	Polyadenylierungssignal
PP	Parentalplasmid
RMCE	<i>Recombinase-Mediated Cassette Exchange</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
S/MAR	<i>Scaffold/Matrix Attachment Region</i>
SAR	<i>Scaffold Attachment Region</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat

sec	Sekunde
SIDD	<i>Stress Induced Duplex Destabilization</i>
SV40	Simian Virus 40
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	<i>units</i> , Einheit zur Kennzeichnung von Enzymaktivitäten
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht/Volumen (Gewichtsprozent)
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Ω	Ohm

6. Literatur

Ahmad K., Golic K.G. (1996). Somatic reversion of chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**: 657-670.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molekularbiologie der Zelle. 4. Auflage, Weinheim, 2004.

Amati B. & Gasser S.M. (1990). Drosophila scaffold-attached regions bind nuclear scaffolds and can function as ARS elements in both budding and fission yeasts. *Mol. Cell Biol.* **10**: 5442-5454.

Archer S., Meng S., Wu J., Johnson J., Tang R., Hodin R. (1998). Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinct pathways. *Surgery* **124**(2): 248-253.

Archer S.Y., Hodin R.A. (1999). Histone acetylation and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* **9**: 171-174.

Argyros O., Wong S.P., Niceta M., Waddington S.N., Howe S.J., Coutelle C., Miller A.D., Harbottle R.P. (2008). Persistent episomal transgene expression in liver following delivery of a scaffold/matrix attachment region containing non-viral vector. *Gene Ther.* **15**: 1593-605.

Baer A. (2002). Funktioneller Vergleich von S/MARs (scaffold/matrix attachment regions') und Insulatoren im chromosomalen Kontext. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.

Baer A., Schuebeler D. & Bode, J. (2000). Transcriptional properties of genomic transgene integration sites marked by electroporation or retroviral infection. *Biochemistry* **39**: 7041-7049.

Baiker A., Maercker C., Piechaczek C., Schmidt S.B.A., Bode J., Benham C. & Lipps H.J. (2000). Mitotic stability of a human scaffold/matrix attachment region containing episomal vector is provided by association with nuclear matrix. *Nat. Cell Biol.* **2**: 182-184.

Baum C., von Kalle C., Staal F.J., Li Z., Fehse B., Schmidt M. (2004). Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol. Ther.* **9**: 5-13.

Benham C. (1996). Duplex destabilization in Superhelical DNA is Predicted to Occur at Specific Transcriptional Regulatory Regions. *J Mol. Biol.* **255**(3): 425-434.

Benham C., Kohwi-Shigematsu T., Bode J. (1997) Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J Mol. Biol.* **274**: 181-96

- Bestor T. H.** (1998). Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature* **393**: 311-2
- Bigger B.W., Tolmachov O., Collombet J.M., Fragkos M., Palaszewski I. and Coutelle C.** (2001). An *araC*-controlled bacterial *cre* expression system to produce DNA Minicircle Vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy. *J. Biol. Chem.* **276**: 23018-23027
- Bode J., Pucher H. J. & Maaß K.** (1986). Chromatin structure and induction-dependent conformational changes of human interferon- β genes in a mouse host cell. *Eur. J. Biochem.* **158**: 393-401
- Bode J., Kohwi Y., Dickinson L., Joh T., Klehr D., Mielke C., Kohwi-Shigematsu T.** (1992). Biological significance of unwinding capability of nuclear matrixassociating DNAs. *Science* **255**: 195-197
- Bode J., Bartsch J., Bouliskas T., Iber M., Mielke C., Schübeler D., Seibler J. & Benham C.** (1998). Transcription-promoting genomic sites in mammalia: their elucidation and architectural principles. *Gene Ther Mol Biol.* **1**: 551-580.
- Bode J., Benham C., Knopp A., Mielke C.** (2000a). Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **10**: 73-90.
- Bode J., Schlake T., Iber M., Schuebeler D., Seibler J., Snezhkov E., Nikolaev L.** (2000b). The transgeneticist's toolbox: novel methods für the targeted modification of the eukaryotic genomes. *Biol. Chem.* **381**: 801-813.
- Bouffler S.D., Morgan W.F., Pandita T.K., Slijepcevic P.** (1996). The involvement of telomeric sequences in chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* **366**: 129-135.
- Bouliskas T.** (1995). Chromatin domains and prediction of MAR-Sequences. *Int. Rev. Cytol.* **162**: 279-288.
- Broach R.J. and Hicks B.J.** (1980). Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 μ circle. *Cell* **21**: 501-501.
- Brown J.M, Green J., Pires das Neves R., Wallace H.A.C., Smith A.J.H., Hughes J., Gray N., Taylor S., Wood W.G., Higgs D.R., Iborra F.J. & Buckle V.J.** (2008). Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *J Cell Biol.* **182(6)**: 1083-97.
- Brzinsky S.C.G., Chiang G. Szilvasi G.A., Mohan S., Shapiro R.I., MacLean A., Sisk G., Thill W.** (2003). A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. *J Immunol. Meth.* **277**: 141-155
- Buchholz F., Angrand P.O. and Stewart F.** (1996). A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res.* **24**: 3118–3119.

- Buchholz F., Angrand P.O. and Stewart F.** (1998). Improved properties of Flp recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* **16**: 657-662.
- Burdon R.H., Quereshi M., Adams R.L.P.** (1985). Nuclear matrix-associated DNA methylase. *Biochem. Biophys. Acta.* **825**: 70-79.
- Bzymek M., Lovett S.T.** (2001). Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple mechanisms. *PNAS.* **98(15)**: 8319-8325.
- Carri M.T., Micheli G., Graziano E., Pace T. & Buongiorno-Nardelli M.** (1986). The relationship between chromosomal origins of replication and the nuclear matrix during the cell cycle. *Exp. Cell Res.* **164**: 426-436.
- Chang C.W., Christensen L.V., Lee M., Kim S.W.** (2008). Efficient expression of vascular endothelial growth factor using minicircle DNA for angiogenic gene therapy. *J Control Release* **125**:155-63.
- Check, E.** (2002). A tragic setback. *Nature* **420**: 116-118.
- Chen C. & Chasin L.A.** (1998). Cointegration of DNA molecules introduced into mammalian cells by electroporation. *Somat Cell Mol Genet.* **24**: 249-56.
- Chen C. & Okayama H.** (1987). High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7(8)**: 2745-2752
- Chen M.R., Tsai C.H., Wu F.F., Kann S.H., Yang C.S. and Chen J.Y.** (1999). The major immunogenic eoitopes of Epstein-Barr Virus (EBV) nuclear antigen 1 are encoded by sequence domains which vary among nasopharyngeal carcinoma biopsies and EBV-associated cell lines. *J. Gen. Virol.* **80**: 447-445.
- Chen Z.Y., He C.Y. and Kay M.A.** (2005). Improved production and purification of Minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences an capable of persistent transgene expression *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* **16**: 126-131.
- Chen Z.Y., He C.Y., Meuse L., Ehrhardt A. and Kay M.A.** (2003). Minicircle DNA vectors devoid bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression *in vivo*. *Mol. Ther.* **8**: 495-500.
- Chen Z.Y., Meuse L. and Kay M.A.** (2004). Silencing of episomal transgene expression by plasmid DNA elements *in vivo*. *Gene Ther.* **11**: 856-864.
- Chen Z.Y., Riu E., He C.Y., Xu H., Kay M.A.** (2008). Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol Ther.* **16**: 548-56.
- Chen Z.Y., Stephen Y.R., He C.Y., Meuse L., Shen S. and Kay M.A.** (2001). Linear DNAs concatetmerize *in vivo* and result in sustained transgene expression in mouse liver. *Mol. Ther.* **3**: 403-410.

Chevalier-Mariette C., Henry I., Montfort L., Capgras S., Forlani, S., Muschler J. and Nicolas J.F. (2003). CpG content affects gene silencing in mice: evidence from novel Transgenes. *Genome Biol.* **4**: R53.

Cockerill P.N., Garrard W.T. (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell.* **44(2)**: 273-282.

Cole, A. (2008). Child in gene therapy programme develops leukaemia. *BMJ* **336**: 13.

Cooper M.J., Lipka M., Payne J.M., Hatzivassiliou G., Reifenberg E., Fayazi B., Perales J.C., Morrison L.J., Templeton, D., Piekarz R.L. and Tan J. (1997). Safety-modified episomal vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 6450-6455.

Cousens L.S., Gallwitz D., Alberts B.M. (1978). Different accessibilities in chromatin to histone acetylase. *Biol. Chem.* **254**: 1716-1723.

Cremer T. and Cremer C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Rev. Genet.* **2**: 292-301.

Cremer T., Kreth G., Koester H., Fink R.H., Heintzmann R., Cremer M., Solovei I., Zink D., Cremer C. (2000). Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **10**: 179-212.

Croft J.A., Bridger J.M., Boyle S., Perry P., Teague P. & Bickmore W.A. (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol.* **145**: 1119-31.

Dang Q., Auten J. and Plavec I. (2000). Human beta interferon scaffold attachment region inhibits *de novo* methylation and confers long-term, copy number-dependent expression to a retroviral vector. *J. Virol.* **74**: 2671-2678.

Darquet A.M., Cameron B., Wils P., Scherman D. and Crouzet J. (1997). A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: Supercoiled minicircle. *Gene Ther.* **4**: 1341-1349.

Darquet A.M., Rangara R., Kreiss P., Schwartz B., Scherman D. and Crouzet J. (1999). Minicircle: An improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer. *Gene Ther.* **6**: 209-218.

Davis P.K., Ho A. & Dowdy S.F. (2001). Biological methods for cell cycle synchronization of mammalian cells. *Biotechniques* **30**: 1322-1331.

de Belle I., Cai S. and Kohwi-Shigematsu T. (1998). The genomic sequences bound to special AT-rich sequence-binding protein 1 (SATB1) in vivo in Jurkat T

cells are tightly associated with the nuclear matrix at the bases of the chromatin loops. *J. Cell Biol.* **141**: 335-348.

Deaven L.L., and Petersen D.F. (1973). The chromosomes of CHO, an aneuploid chinese hamster cell line: G-Band, C-Band and autoradiographic analyses. *Chromosoma* **41**: 129-144.

Derouazi, M., Martinet, D., Besuchet N., Flaction R., Wicht M., Bertschinger M., Hacker D., Beckmann J., Wurm F.M. (2007). Stability and Cytogenetic Characterization of Recombinant CHO Cell Lines Established by Microinjection and Calcium Phosphate Transfection. *Cell Technology for Cell Products*: 443-446.

Dickinson L.A., Dickinson C.D., and Kohwi-Shigematsu T. (1997). An atypical homeodomain in SATB1 promotes specific recognition of the key structural element in a matrix attachment region. *J. Biol. Chem.* **272**: 11463-11470.

Dickinson L.A., Joh T., Kohwi Y. and Kohwi-Shigematsu T. (1992). A tissuespecific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* **70**: 631-645.

Dietzel S., Schiebel K., Little G., Edelmann P., Rappold G. A., Eils R., Cremer C., Cremer T. (1999) The 3D positioning of ANT2 and ANT3 genes within female X chromosome territories correlates with gene activity. *Exp Cell Res.* **252(2)**: 363-75

Dijkwel P.A. & Hamlin J.L. (1995). Origins of replication and DHFR domain as a paradigm. *Int.Rev.Cytol.* **162A**: 455-484.

Ehrhardt A., Peng P.D., Hui X., Meuse L. and Kay M.A. (2003). Optimization of *cis*-acting elements for gene expression from nonviral vectors *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* **14**: 215-225.

Engelhardt J.F., Yang Y., Stratford-Perricaudet L.D., Allen E.D., Kozarsky K., Perricaudet M., Yankaskas J.R. and Wilson J.M. (1993). Direct gene transfer of human CFTR into human branchia epithelia of xenografts with E1-deleted adenoviruses. *Nat. Genet.* **4**: 1069-1078.

Fackelmayer F.O. (2000). Die Architektur des Zellkerns. *BioSpectrum* **6**: 441-444.

Fackelmayer F.O., Dahm K., Renz A., Ramsperger U., and Richter A. (1994). Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* **221**: 749-57.

Fanning E. and Knippers R. (1992). Structure and function of Simian Virus 40 Large Tumor Antigen. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 55-85.

Fey E.G., Ornelles D.A. & Penman S. (1986). Association of RNA with the cytoskeleton and the nuclear matrix. *J Cell Sci Suppl* **5**: 99-119.

Fiering S., Kim C., Epner E. and Groudine M. (1993). An "in-out" strategy using gene targeting and FLP recombinase for the functional dissection of complex DNA regulatory elements: Analysis of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8469-8473.

Foster K.A. and Collins J.M. (1985). The interrelation between DNA synthesis rates and DNA polymerases bound to the nuclear matrix in synchronised HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **260**: 4229-4235.

Gahn T.A. and Schildkraut C.L. (1989). The Epstein-Barr Virus Origin of Replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA-Replication. *Cell* **58**: 527- 535.

Gasser S.M. and Laemmli U.K. (1986). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* **46**: 521-530.

Giannakopoulos A., Stavrou E.F., Zarkadis I., Zoumbos N., Thrasher A.J. & Athanassiadou A. (2009). The Functional Role of S/MARs in Episomal Vectors as defined by the Stress-Induced Destabilization Profile of the Vector Sequences. *J Mol Biol.* 2009 Feb 25. [Epub ahead of print]

Gluch A., Vidakovic M. & Bode J. (2008). Scaffold/matrix Attachment Regions (S/MARs): Relevance for Disease and Therapy, Protein-Protein-Interactions as New Drug Targets. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Klussmann E., Scott J.D. eds. **186**: 67-103.

Goetze S., Baer A., Winkelmann S., Nehlsen K., Seibler J., Maass K. & Bode J. (2005). Performance of genomic bordering elements at predefined genomic loci. *Mol. Cell Biol.* **25**: 2260-2272.

Goetze S. (2003). Funktionsanalysen nicht-kodierender genomischer DNA-Bereiche unter Berücksichtigung biomathematischer Modelle. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.

Grosjean F., Batard P., Jordan M., Wurm F.M. (2002). S-phase synchronized CHO cells show elevated transfection efficiency and expression using CaPi. *Cytotechnology* **38**: 57-63.

Hacein-Bey-Abina S., von Kalle C., Schmidt M., McCormack M.P., Wulffraat N., Leboulch P. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**: 415-419.

Hague A. Elder D.J., Hicks D.J., Paraskeva C. (1995). Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int J Cancer.* **60(3)**: 400-406.

Harland R.M., Weintraub H., McKnight S.L. (1983). Transcription of DNA injected into *Xenopus* oocytes is influenced by Template topology. *Nature* **302**: 38-43.

Hartley J.L. and Donelson J.E. (1980). Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature* **286**: 860-865.

Hartwell L. H. & Weinert T. A. (1989): Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246(4930)**: 629-634.

Hendzel M.J., Delcuve G.P. and Davie J.R. (1991). Histone deacetylase is component of the internal nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* **266**: 21936-21942.

Hendzel M.J., Sun J.M., Chen H.Y., Rattner J.B. and Davie J.R. (1994). Histone acetyltransferase is associated with the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* **269**: 22894-22901.

Herweijer H., Zhang G., Subbotin V.M., Budker V., Williams P. & Wolff J.A. (2001). Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *J. Gene Med.* **3**: 280-291.

Hirt B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cultures. *J. Mol. Biol.* **26**: 365-369.

Hong K., Sherley J., Lauffenburger D.A. (2001). Methylation of episomal plasmids as a barrier to transient gene expression via a synthetic delivery vector. *Biomol. Eng.* **18**: 185-192.

Hörtnagel K., Mautner J., Strobl L.J., Wolf D.A., Christoph B., Geltinger C., Polack A. (1995) The role of immunoglobulin kappa elements in *c-myc* activation. *Oncogene* **10**: 1393-401

Hsieh C.L. (1997). Stability of patch methylation and its impact in regions of transcriptional initiation and elongation. *Mol Cell. Biol.* **17**: 5897-5904.

Iqbal K., Barg-Kues B., Broll S., Bode J., Niemann H., Kues W. A. (2009): Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos. *BioTechniques* **47 (5)**: 959–968.

Jenke A.C.W., Scinteie M.F., Stehle I.M. & Lipps H.J. (2004b). Expression of a transgene encoded on a non-viral episomal vector is not subject to epigenetic silencing by cytosine methylation. *Mol. Biol. Rep.* **31**: 85-90.

Jenke A.C.W., Stehle I.M., Herrmann F., Eisenberger T., Baiker A., Bode J., Fackelmayer F.O. & Lipps, H.J. (2004a). Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 11322-11327.

Jenke B.H.C., Fetzer C.P., Stehle I.M., Jönsson F., Fackelmayer F.O., Conradt H., Bode J. & Lipps H.J. (2002). An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A *in vivo*. *EMBO Rep.* **3**: 349-354.

Kaiser J. (2003). Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science* **299**: 457–608.

Kanda T., Kamiya M., Maruo S., Iwakiri D. & Takada K. (2007). Symmetrical localization of extrachromosomally replicating viral genomes on sister chromatids. *J Cell Sci.* **120**: 1529-1539

Kilby N.J., Snaith M. & Murray J. (1993). Site specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* **9**: 413-421.

Klehr D., Schlake T., Maaß K. & Bode J. (1991). Scaffold-attached regions (SAR elements) mediate transcriptional effects due to butyrate. *Biochemistry* **31**: 3222-3229.

Kouraklis G., Theocharis S. (2006). Histone deacetylase inhibitors: a novel target of anticancer therapy (review). *Oncol Rep.* **15(2)**: 489-494.

Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V. M., Dolci, S., Farace, M. G., Spadafora, C. (1989). Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* **57**: 717–723.

Lewis C.D., Lebkowski J.S., Daly, A.K. & Laemmli U.K. (1984). Interphase nuclear matrix and metaphase scaffolding structures. *J. Cell Sci.* **1**: 103-122.

Li Z., Düllmann J., Schiedlmeier B., Schmidt M., von Kalle C., Meyer J., Forster M., Stocking C., Wahlers A., Frank O., Ostertag W., Kühlcke K., Eckert H.G., Fehse B. and Baum C. (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* **296**: 497.

Lichter P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L., Ward D.C. (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet.* **80**: 224-34.

Ludérus M.E.E., de Graaf A., Mattia E., den Blaauwen J.L., Grande M.A., de Jong L. and van Driel R. (1992). Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* **70**: 949-959.

Ludérus M.E.E., Den Blaauwen J.L., De Smit O.J.B., Compton D.A. and van Driel R. (1994). Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves singlestranded regions and the minor groove. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 6297-6305.

Ma H., Siegel A.J., Berezney R. (1999). Association of chromosome territories with the nuclear matrix: disruption of human chromosome territories correlates with a release of a subset of nuclear matrix proteins. *J Cell Biol.* **146**: 531-541.

Manzini S., Vargiolu A., Stehle I.M., Bacci M.L., Cerrito M.G., Giovannoni R., Zannoni A., Bianco M.R., Forni M., Donini P., Papa M., Lipps H.J. & Lavitrano M. (2006). Genetically modified pigs produced with a nonviral episomal vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103(47)**: 17672-7

Marshall, E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science.* **286**: 2244-2245

Marie C., Richard M., Vandermeulen G., Quiviger M., Preat V. & Scherman D. (2008). pFAR plasmids: New Eukaryotic Expression Vectors for Gene Therapy, devoid of Antibiotic Resistance Markers. Available from *Nature Precedings*. <http://hdl.handle.net/10101/npre.2008.2395.1>

Marshall E. (2001). Clinical research. Gene therapy: a suspect in leukemia-like disease. *Science* **298**: 34-35.

Martens J.H., Verlaan M., Kalkhoven E., Dorsman J.C., Zantema A. (2002) Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 2598-606

Mayrhofer P., Blaesen M., Schleef M., Jechlinger W. (2008). Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein-DNA interaction chromatography. *J Gene Med* **10**: 1253-1269.

Mirkovitch J., Gasser S.M. and Laemmli U.K. (1988). Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes. *J. Mol. Biol.* **200**: 101-110.

Modlich U., Kustikova O.S., Schmidt M., Rudolph C., Meyer J., Li Z., Kamino K., von Neuhoff N., Schlegelberger B., Kuehlcke K., Bunting K.D., Schmidt S., Deichmann A., von Kalle C., Fehse B. and Baum C. (2005). Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (*MDR1*) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood* **105**: 4235-4246.

Nam, C.H. & Rabbitts, T.H. (2006). The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. *Mol Ther* **13**: 15-25.

Namciu S.J., Blochlinger K.B. & Fournier R.E. (1998). Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* **18**: 2382-2391.

Nan X., Ng H., Johnson C. A., Laherty C. D., Turner B. M., Eisenman R. N. and Bird A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386-389.

Nehlsen K. (2004). Molekulare Grundlagen der episomalen Replikation: Charakterisierung zirkulärer, nicht-viraler Vektoren. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.

Nehlsen K., Broll S., Bode J. (2006). Replicating minicircles: Generation of nonviral episomes for the efficient modification of dividing cells. *Gene Ther Mol Biol.* **10**: 233-244.

Nickerson J.A., Krochmalnic G., Wan K.M. & Penman S. (1989). Chromatin architecture and nuclear RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**: 177-181.

Nigg E.A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays.* **17(6)**: 471-80

O'Brien T.P., Bult C.J., Cremer C., Grunze M., Knowles B.B., Langowski J., McNally J., Pederson T., Politz J.C., Pombo A., Schmahl G., Spatz J.P. & van Driel R. (2003). Genome Function and Nuclear Architecture: From Gene Expression to Nanoscience. *Genome Research.* **13**: 1029–1041

O'Keefe R.T., Henderson S.C. & Spector D.L. (1992). Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *J Cell Biol.* **116**: 1095-1110.

Palmer D.G., Paraskeva C., Williams A.C. (1997). Modulation of p53 expression in cultured colonic adenoma cell lines by the naturally occurring luminal factors butyrate and deoxycholate. *Int J Cancer.* **73(5)**: 702-706.

Papapetrou E.P., Ziros P.G., Micheva I.D., Zoumbos N.C. and Athanassiadou A. (2005). Gene transfer into human hemopoietic progenitor cells with an episomal vector carrying an S/MAR element. *Gene Ther.* **13(1)**: 40-51.

Paulson J.R. and Laemmli U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* **12**: 817-828.

Piechaczek C., Fetzer C., Baiker A., Bode J. and Lipps H.J. (1999). A vector based on the SV40 Origin of Replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO-K1 cells. *Nucl. Acids Res.* **27**: 426-428.

Renz A., and Fackelmayer F.O. (1996). Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J.* **11**: 3431-3440.

Richards E.J. & Elgin S.C.R. (2002). Epigenetic Codes for Heterochromatin Formation and Silencing: Rounding up the Usual Suspects. *Cell.* **108**: 489–500

Richmond T.J., Finch J.T., Rushton B., Rhodes D., Klug A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* **311**: 532-537.

Riu E., Chen Z.Y., Xu H., He C.Y., Kay M.A. (2007). Histone modifications are associated with the persistence or silencing of vector-mediated transgene expression in vivo. *Mol Ther.* **15**: 1348-55.

Riu E., Grimm D., Huang Z. and Kay M.A. (2005). Increased persistence of transgenes by excision of expression cassettes from plasmid sequences in vivo. *Hum. Gene Ther.* **16**: 558-570.

Roemig H., Fackelmayer F.O., Renz A., Ramsperger U. and Richter A. (1992). Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J.* **11**: 3431-3440.

Ross P.C. & Hui S.W. (1999). Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency. *Gene Ther.* **6**: 651-659.

Ruemmele F.M., Dionne S., Qureshi I., Sarma D.S., Levy E., Seidman E.G. (1999). Butyrate mediates Caco-2 cell apoptosis via up-regulation of pro-apoptotic BAK and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP). *Cell Death Differ.* **6**(8): 729-735.

Schaarschmidt D., Baltin J., Stehle I.M., Lipps H.J. and Knippers R. (2004). An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *EMBO J.* **23**: 191-201.

Scheule R.K. (2000). The role of CpG motifs in immunostimulation and gene therapy. *Adv. Drug Deliv.* **44**: 119-134.

Schirmbeck R. and Deppert W. (1987). Specific interaction of Simian Virus 40 large T antigen with cellular chromatin and nuclear matrix during the course of infection. *J. Virol.* **61**: 3561-3569.

Schirmbeck R. and Deppert W. (1991). Structural topography of Simian Virus 40 DNA replication. *J. Virol.* **65**: 2578-2588.

Schlake T., Klehr-Wirth D., Yoshida M., Beppu T., Bode J. (1994). Gene expression within a chromatin domain: The role of core histone hyperacetylation. *Biochemistry* **33**: 4197-4206.

Schuebeler D., Maaß K. and Bode J. (1998). Retargeting of retroviral integration sites for the predictable expression of transgenes and the analysis of cis-acting sequences. *Biochemistry.* **37**: 11907-11914.

Schuebeler D., Mielke C., Maaß K., Bode J. (1996) Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context-dependent manner. *Biochemistry* **35**: 11160-11169.

Sealy L. & Chalkley R. (1978). The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* **14**: 115-121.

Seibler J., Schuebeler D., Fiering S., Groudine M. & Bode J. (1998). DNA cassette exchange in ES cells mediated by Flp recombinase: an efficient strategy for

repeated modification of tagged loci by marker-free constructs. *Biochemistry* **37**: 6229-6234.

Senecoff J.F. and Cox M.M. (1986). Directionality in FLP protein-promoted sitespecific recombination is mediated by DNA-DNA pairing. *J. Biol. Chem.* **261**: 7380-7386.

Sgourou A., Routledge S., Spathas D., Athanassiadou A. & Antoniou M.N. (2009). Physiological Levels of HBB Transgene Expression from S/MAR Element-based Replicating Episomal Vectors. *Zur Veröffentlichung eingereicht*.

Siavoshian S., Blottiere H.M., Cherbut C., Galmiche J.P. (1997). Butyrate stimulates cyclin D and p21 and inhibits cyclin-dependent kinase 2 expression in HT-29 colonic epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **232(1)**: 169-172.

Singh G. B., Kramer J. A., Krawetz S. A. (1997). Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res.* **25**: 1419-1425

Stehle I.M., Postberg J., Rupprecht S., Cremer T., Jackson D.A. & Lipps H.J. (2007). Establishment and mitotic stability of an extra-chromosomal mammalian replicon. *BMC Cell Biol.* **8**: 33

Stehle I.M., Scinteie M.F., Baiker A., Jenke A.C.W. and Lipps H.J. (2003). Exploiting a minimal system to study the epigenetic control of DNA replication: the interplay between transcription and replication. *Chrom. Res.* **11**: 413-421.

Stenler, S., Andersson A., Simonson O.E., Lundin K.E., Chen Z.Y., Kay M.A., Smith C.I., Sylvén C., Blomberg P. (2009). Gene Transfer to Mouse Heart and Skeletal Muscles Using a Minicircle Expressing Human Vascular Endothelial Growth Factor. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009 Jan 6. [Epub ahead of print]

Stief A., Winter D.M., Stratling W.H., & Sippel A.E. (1989). A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* **341**: 343-345.

Szüts D. & Krude T. (2004). Cell cycle arrest at the initiation step of human chromosomal DNA replication causes DNA damage. *J Cell Sci.* **117**: 4897-4908.

Tabaska J.E. & Zhang M.Q. (1999). Detection of polyadenylation signals in human DNA sequences. *Gene* **231**: 77-86

Thomas C.E., Ehrhardt A. and Kay M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Rev. Genet.* **4**: 346-358.

Tóth K.F., Knoch T.A., Wachsmuth M., Frank-Stöhr M., Stöhr M., Bacher C.P., Müller G. & Rippe K. (2004). Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *Journal of Cell Science* **117**: 4277-4287

Utlely R.T., Ilkeda K., Grant P.A., Cote J., Steger D.J., Eberharter A., John S., Workman J.L. (1998). Transcriptional activators direct histone acetyl complexes to nucleosomes. *Nature* **394**: 498-502.

Vidakovic M., Poznanovic G., Bode J. (2005). DNA break repair: Refined rules of an already complicated game. *Biochem Cell Biol.* **83**: 365–373

Volkert F.C., Wilson D.W. and Broach J.R. (1989). Deoxyribonucleic acid plasmids in yeast. *Microbiological Reviews* **53**: 299-317.

von Kries J. P., Buhrmester H. and Strätling W.H. (1991). A matrix/scaffold attachment region binding protein: Identification, purification, and mode of binding. *Cell* **64**: 123-135.

Weitzel J.M., Buhrmeister H. and Stratling W.H. (1997). Chicken MAR-binding protein ARBP is homologous to rat methyl-CpG binding protein MeCP2. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5656-5666.

Wessel R., Schweizer J. and Stahl H. (1992). Simian Virus 40 T-Antigen DNA Helicase is a hexamer which forms a binary complex during bidirectional unwinding from the viral origin of DNA replication. *J. Virol.* **66**: 804-815.

Williams D.A. and Baum C. (2003) Gene therapy – New challenges ahead. *Science* **203**: 400-401.

Winkelmann S., Klar M., Benham C., AK P., Goetze S., Gluch A. & Bode J. (2006). The positive aspects of stress: Strain Initiates Domain Decondensation (SIDD). *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* **5**: 24-31.

Wollfe A. and Pruss D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* **84**: 817-81.

Woods, N.B., Bottero, V., Schmidt, M., von Kalle, C., Verma, I.M. (2006). Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature* **440**: 1123.

Yang Y., Nunes F.A., Berencsi K., Furth E.E., Gönczöl E. and Wilson J.M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *PNAS.* **91**: 4407-4411.

Yenofsky R.L., Fine M. & Pellow W. (1990). A mutant neomycin phosphotranferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. *PNAS* **87(9)**: 3435-3439.

Yoshida M., Kijima M., Akita M., Beppu T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by Trichostatin A. *Biol. Chem.* **265**: 17174-17179.

Zaret K. S., Sherman F. (1982). DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell* **28**: 563-573

Zehnbauer B.A. & Vogelstein B. (1985). Supercoiled loops and the organization of replication and transcription in eukaryotes. *BioEssays* **2**: 52-54.

7. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Epigenetische Regulationsmechanismen im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig) unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Bode angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode möchte ich für die Bereitstellung des Themas, für das stete Interesse an meiner Arbeit, seine Begeisterung und die guten Ideen, für die durchgehende Unterstützung und Motivation sowie für seine Mühen bei der Korrektur dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel danke ich für das Korreferat und dafür, dass er zusammen mit Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode die Arbeit vor der Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Braunschweig vertritt. Auch Herrn Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel danke ich für seine Bereitschaft zur Teilnahme an der Promotionskommission.

Großer Dank gilt auch allen Kooperationspartnern - Dr. Martin Schleef und Dr. Marco Schmeer von der PlasmidFactory GmbH (Bielefeld), Prof. Dr. Christopher Baum und Dr. Axel Schambach von der Abteilung Experimentelle Hämatologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Dr. Wilfried Kues und Khursheed Iqbal vom Institut für Tierzucht (Mariensee), Dr. Götz Laible und Dr. Stefan Wagner vom Ruakura Research Centre (Hamilton, Neuseeland) sowie Dr. Aziz Cayli und Dr. André Engling von der Cellca GmbH (Laupheim) - für die gute Zusammenarbeit, die Bereitstellung von Materialien und die Unterstützung beim Auswerten und Analysieren von Daten.

Und ich möchte den (Ex-) EPIs Manfred Wirth, Melita Vidakovic, Junhua Qiao, Sören Turan, Angela Gluch, Stefanie Binius, Markus Heine, Lijing Sun, Martina Dötsch, Martin Klar, Raju Kandimalla, Karin Maass und besonders Astrid Hans danken. Ein weiteres großes Dankeschön geht an Maria Höxter. Danke auch an all meine Kollegen in den Arbeitsgruppen RDIF und MSYS für das tolle Arbeitsklima, besonders an Sara, Pamela, das komplette EXIL und Peter.

Ein riesengroßes Dankeschön geht natürlich an Kristina Nehlsen und André Oumard für die Hilfe und Unterstützung in fachlichen und anderen Fragen sowie an Holger Lößner, Wilhelm Dirks (DSMZ) und Mario Köster für die Teilnahme am „Thesis Komitee“.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung. Ich danke ganz besonders meiner Schwester und meinem Freund Kai dafür, dass sie mich vor allem in der Endphase immer wieder aufgemuntert und ermutigt haben.